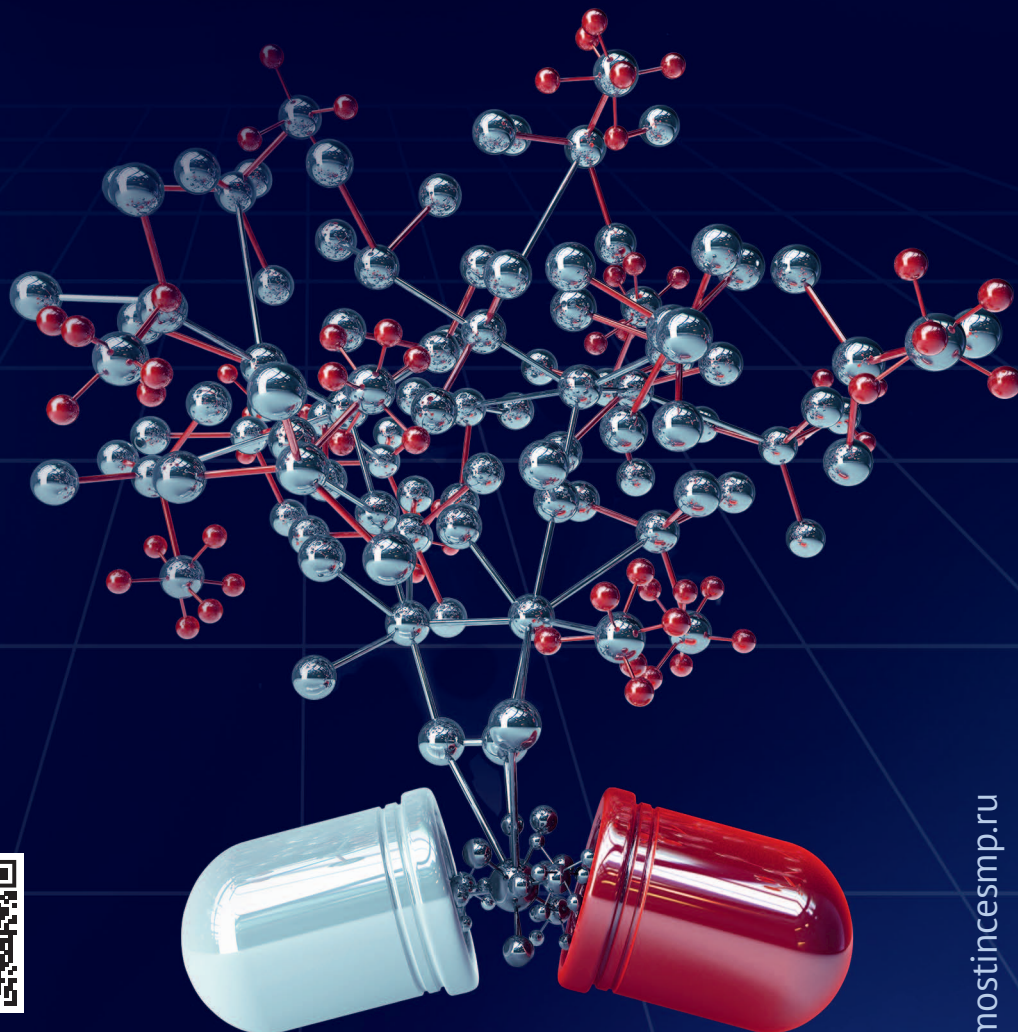


Том 15, № 5
Vol. 15, No. 5
2025

ISSN 3034-3062 (Print)
ISSN 3034-3453 (Online)

Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств



Regulatory research and medicine evaluation

ГЛАВНАЯ ТЕМА

Стадии жизненного цикла лекарственного препарата

www.vedomostincesmp.ru

QR-гид: документы в мгновенном доступе

Основные российские и зарубежные нормативные акты, касающиеся фармакопей



Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»



Решение от 22.09.2015 № 119 Коллегии Евразийской экономической комиссии «О Концепции гармонизации фармакопей государств – членов Евразийского экономического союза»



Приказ Минздрава России от 19.11.2013 № 857 «О Совете Министерства здравоохранения Российской Федерации по государственной фармакопее»



Стратегия развития Фармакопей Евразийского экономического союза на период 2024–2035 гг.



Государственная фармакопея Российской Федерации



Международная фармакопея



Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11.08.2020 № 100 «О Фармакопее Евразийского экономического союза»



Фармакопея Евразийского экономического союза



Приказ Минздрава России от 13.09.2024 № 468н «Об утверждении порядка разработки общих фармакопейных статей и фармакопейных статей и включения их в государственную фармакопею, а также порядка размещения данных о государственной фармакопее и приложениях к ней на официальном сайте Министерства здравоохранения Российской Федерации в информационно-телекоммуникационной сети “Интернет”»

Расширенный перечень нормативных документов в области регулирования экспертизы и регистрации лекарственных средств представлен на сайте ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России <https://www.regmed.ru/activity/normativnye-pravovye-akty-ls/>





Уважаемые коллеги!

Создание безопасного, эффективного и качественного лекарственного препарата – это сложный путь, регламентированный на каждом этапе. От разработки идеи до появления на фармацевтическом рынке препарат проходит многоступенчатую систему оценки, и от слаженности работы этой системы напрямую зависит здоровье миллионов пациентов. Именно поэтому тема нового выпуска журнала посвящена основным стадиям обращения лекарственных средств. Особую актуальность это направление имеет для России в свете реализации государственной политики развития отечественной фармацевтической индустрии. Повышение научно-технологического суверенитета в сфере разработки и производства лекарств основано на безупречном понимании и соблюдении регуляторных требований на всех стадиях обращения лекарственного средства: от доклинических исследований до контроля качества готовой продукции.

Выпуск журнала открывает эксклюзивное интервью, посвященное развитию и роли Государственной фармакопеи Российской Федерации – основополагающего нормативного акта в обеспечении качества лекарственных средств. Это интервью задает тон всему журналу, подчеркивая, что без надежной нормативной базы и единых стандартов невозможно выстроить эффективную систему обращения лекарственных средств.

В других статьях выпуска последовательно рассмотрен полный жизненный цикл лекарственных препаратов. Опубликованы работы по доклиническому изучению фармакокинетики новых субстанций, методологии клинических исследований и разработке современных лекарственных форм. Особое внимание уделено актуальным вопросам контроля качества (в том числе высокотехнологичных лекарственных препаратов), включая переход к альтернативным методам анализа в рамках концепции 3R и стандартизацию перспективных лекарственных средств. Завершает эту цепочку исследование, посвященное безопасности конечного применения лекарственных средств через анализ понятности медицинских терминов, изложенных в инструкциях по медицинскому применению.

Этот выпуск будет полезен широкому кругу специалистов: разработчикам лекарственных средств, специалистам по контролю качества, фармацевтическим технологам, клиническим фармакологам, а также экспертам научных и регуляторных институтов. Уверена, что материалы этого выпуска не только расширят профессиональный кругозор наших читателей, но и дадут им практические инструменты для решения конкретных задач.

*Искренне ваша,
главный редактор*

**Косенко
Валентина Владимировна**

Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств

Рецензируемый научно-практический журнал

Учредитель и издатель:

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Главный редактор:

Косенко Валентина Владимировна, канд. фарм. наук

Шеф-редактор:

Федотова Ольга Федоровна
тел.: +7 (495) 121-06-00 (доб. 63-05)
Fedotovaof@expmed.ru

Ответственный редактор:

Гойкалова Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, доц.

Научный редактор:

Хрущева Мария Леонидовна, канд. хим. наук

Редактор:

Калиничев Сергей Анатольевич, канд. фарм. наук

Редактор перевода:

Агафонищева Тамара Владимировна

Менеджер по развитию:

Мжельский Александр Анатольевич

Адрес учредителя, издателя и редакции:

127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2
тел.: +7 (499) 190-18-18
(доб. 63-42, 63-65)
vedomosti@expmed.ru

www.vedomostincesmp.ru

Журнал основан в 1999 году.

Предыдущее название журнала: Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств (до мая 2024 г.)

Выходит шесть раз в год.

Журнал открытого доступа, индексируется в российских и международных реферативных и индексных базах данных: Chemical Abstracts (CAS), Embase, Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), Russian Science Citation Index (RSCI), RUSMED, его архив включен в базы крупнейших агрегаторов научных ресурсов и библиотек WorldCat, DOAJ, Российская государственная библиотека, Академия Google (Google Scholar), КиберЛенинка, BASE, Dimensions, Open Archives Initiative, ResearchBib, ЭБС ЛАНБ, Research4life, Lens.org, Openaire.eu, Ulrichsweb, Mendeley, Unpaywall, OpenCitations и др.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ – 0,533.

Входит в Единый государственный перечень научных изданий (ЕГПНИ) – «Белый список», а также в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (категория К1).

В журнале освещаются передовые достижения в сфере стандартизации и оценки качества лекарственных препаратов различных групп, разработки и совершенствования методик фармацевтического анализа, методологии экспертизы лекарственных средств, в том числе по установлению их взаимозаменяемости, обсуждаются новые высокотехнологические методы доклинических и клинических исследований лекарственных средств, рассматриваются актуальные проблемы фармакологии, клинической медицины, вопросы рационального применения лекарственных препаратов на основе принципов персонализированной терапии.

К публикации в журнале принимаются обзорные и оригинальные статьи, методические материалы, тематика которых соответствует медицинским, фармацевтическим и химическим отраслям науки и следующим научным специальностям:

- Промышленная фармация и технология получения лекарств;
- Фармацевтическая химия, фармакогнозия;
- Организация фармацевтического дела;
- Фармакология, клиническая фармакология.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается
Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution International 4.0 (CC BY 4.0)

Подписано в печать:	30.10.2025
Дата выхода в свет	14.11.2025
Подписной индекс	в каталоге «Пресса России» – 57942
	в каталоге агентства «Урал-Пресс» – 57942

© Оформление, составление. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2025

Редакционная коллегия

Главный редактор

Косенко Валентина Владимировна, канд. фарм. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Заместители главного редактора

Петров Владимир Иванович, акад. РАН, д-р мед. наук, проф., ВолгГМУ (Волгоград, Россия)

Гравель Ирина Валерьевна, д-р фарм. наук, проф., Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Рождественский Дмитрий Анатольевич, канд. мед. наук, Департамент технического регулирования и аккредитации ЕЭК (Москва, Россия)

Ответственный секретарь

Хрущева Мария Леонидовна, канд. хим. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Члены редакционной коллегии

Астапенко Елена Михайловна, канд. техн. наук, Минздрав России (Москва, Россия)

Бунятян Наталья Дмитриевна, д-р фарм. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Глаголев Сергей Владимирович, Минздрав России (Москва, Россия)

Горячев Дмитрий Владимирович, д-р мед. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Гурина Наталия Сергеевна, д-р биол. наук, проф., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Республика Беларусь)

Дмитриев Виктор Александрович, канд. мед. наук, Ассоциация российских фармацевтических производителей (Москва, Россия)

Дурнев Андрей Дмитриевич, акад. РАН, д-р мед. наук, проф., НИИ фармакологии им. В.В. Закусова (Москва, Россия)

Егорова Светлана Николаевна, д-р фарм. наук, проф., Казанский ГМУ (Казань, Россия)

Звартау Эдвин Эдуардович, д-р мед. наук, проф., Первый СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия)

Кайтель Сьюзан, Ph.D. (Бонн, Германия)

Ковалева Елена Леонардовна, д-р фарм. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Кодина Галина Евгеньевна, канд. хим. наук, доцент, ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Кошевенко Анастасия Сергеевна, канд. фарм. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук, НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (Ленинградская область, Россия)

Ордабаева Сауле Кутымовна, д-р фарм. наук, проф., Южно-Казахстанская медицинская академия (Шымкент, Республика Казахстан)

Потанина Ольга Георгиевна, д-р фарм. наук, проф., МГУ им. М.В. Ломоносова (Москва, Россия)

Сычев Дмитрий Алексеевич, акад. РАН, д-р мед. наук, проф., РМАНПО (Москва, Россия)

Сюбаев Рашид Даутович, д-р мед. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Шимановский Николай Львович, член-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., РНИМУ им. Н.И. Пирогова (Москва, Россия)

Ягудина Роза Исмаиловна, д-р фарм. наук, проф., Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Регистрация	Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство ПИ № ФС77-82931 от 14 марта 2022 г.
Исполнитель	ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5
Типография	ООО «Издательство «Триада»: 170034, Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 514
Тираж	100 экз. Цена свободная

Regulatory Research and Medicine Evaluation

Regulyatornye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv

A peer-reviewed research and practice journal

Founder and publisher:

Federal State Budgetary Institution 'Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products' of the Ministry of Health of the Russian Federation

Editor-in-Chief:

Valentina V. Kosenko,
Cand. Sci. (Pharm.)

Managing Editor:

Olga F. Fedotova
tel.: +7 (495) 121-06-00 (ext. 63-05)
Fedotovaof@expmed.ru

Executive Editor:

Olga Yu. Goykalova, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.

Science Editor:

Maria L. Khrushcheva, Cand. Sci. (Chem.)

Editor:

Sergey A. Kalinichev, Cand. Sci. (Pharm.)

Translation Editor:

Tamara V. Agafonycheva

Development Manager:

Alexander A. Mzhelsky

Postal address of the founder, publisher, and editorial office:

8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051
tel.: +7 (499) 190-18-18
(ext. 63-42, 63-65)
vedomosti@expmed.ru

www.vedomostincesmp.ru

The journal was founded in 1999.

The journal was titled *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation* until May 2024.

The journal is published six times per year.

This is an open-access journal indexed in Russian and international abstracting and indexing databases: Chemical Abstracts (CAS), Embase, Russian Index of Science Citation (RISC), Russian Science Citation Index (RSCI), and RUSMED, with the archive included in major aggregator databases, such as WorldCat, DOAJ, Russian State Library, Google Scholar, CyberLeninka, BASE, Dimensions, Open Archives Initiative, ResearchBib, Lan' ELS, Research4life, Lens.org, Openaire.eu, Ulrichsweb, Mendeley, Unpaywall, OpenCitations, etc.

The journal's two-year impact factor is 0.533.

The journal is included in the Unified State List of Scientific Publications ("White List") and the List of peer-reviewed scientific publications that the State Commission for Academic Degrees and Titles recommends for publishing the main scientific results of theses for Candidate of Science and Doctor of Science degrees.

The journal covers advances in the areas of standardisation and quality control of various groups of medicines, development and improvement of analytical test procedures, and approaches to the evaluation of medicinal products, including the assessment of medicines interchangeability. It discusses new sophisticated methods of preclinical and clinical research, relevant issues of pharmacology and clinical medicine, and rational use of medicines based on personalised medicine principles.

The journal publishes reviews and original articles, guidance materials related to medical and pharmaceutical sciences and the following specialist fields:

- Pharmaceutical formulation and manufacturing;
- Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy;
- Pharmaceutical management;
- Pharmacology, clinical pharmacology.

There is no fee for publishing an article and reviewing a manuscript
The content is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International licence (CC BY 4.0)

Passed for printing:	30.10.2025
Date of publication:	14.11.2025
Subscription codes	Pressa Rossii catalogue: 57942
	Ural-Press agency catalogue: 57942

© Compilation, design. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 2025

Editorial Board

Editor-in-Chief

Valentina V. Kosenko, Cand. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Deputy Editors-in-Chief

Vladimir I. Petrov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Volgograd State Medical University (Volgograd, Russia)

Irina V. Gravel, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Dmitry A. Rozhdestvensky, Cand. Sci. (Med.), Technical Regulation and Accreditation Department of the Eurasian Economic Commission (Moscow, Russia)

Executive Secretary

Maria L. Khrushcheva, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Editorial Board Members

Elena M. Astapenko, Cand. Sci. (Tech.), Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Natalya D. Bunyatyan, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Sergey V. Glagolev, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Dmitriy V. Goryachev, Dr. Sci. (Med.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Natalia S. Gurina, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Republic of Belarus)

Victor A. Dmitriev, Cand. Sci. (Med.), Association of the Russian Pharmaceutical Manufacturers (Moscow, Russia)

Andrey D. Durnev, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Zakusov Institute of Pharmacology (Moscow, Russia)

Svetlana N. Egorova, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Kazan Medical University (Kazan, Russia)

Edwin E. Zvartau, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University (Saint Petersburg, Russia)

Susanne Keitel, Ph.D. (Bonn, Germany)

Elena L. Kovaleva, Dr. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Galina E. Kodina, Cand. Sci. (Chem.), Assoc. Prof., National Medical Research Radiological Centre (Moscow, Russia)

Anastasia S. Koshevenko, Cand. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Natalia E. Kuz'mina, Dr. Sci. (Chem.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.), Research-and-manufacturing Company 'HOME OF PHARMACY' (Leningrad Region, Russia)

Saule K. Ordabaeva, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., South Kazakhstan Medical Academy (Shymkent, Republic of Kazakhstan)

Olga G. Potanina, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia)

Dmitry A. Sychev, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Russian Medical Academy of Continuous Professional Education (Moscow, Russia)

Rashid D. Syubaev, Dr. Sci. (Med.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Nikolay L. Shimanovskiy, Corresponding Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., N.I. Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Roza I. Yagudina, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Registration	The journal is registered as a mass medium by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications. Certificate PI No. FS77-82931 dated March 14, 2022
Contract publisher	NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow 115114
Printing office	Triada Publishing House: 9 Tchaikovsky Ave, office 514, Tver 170034
Print run	100 copies. Free price

Содержание

Том 15, №5 2025

ГЛАВНАЯ ТЕМА:	СТАДИИ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА
В.Л. Багирова 492	Роль ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в формировании современных фармакопейных требований
ПОДГОТОВКА РЕГИСТРАЦИОННЫХ ДОКУМЕНТОВ	
Е.И. Морковин, Е.Ю. Сорокина, А.Г. Солодовников, Д.В. Куркин, А.А. Селезнева, С.А. Лешкова, А.В. Заборовский 497	Пользовательское тестирование как способ оценки понимания медицинских терминов, используемых в листках-вкладышах
ДОКЛИНИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
И.И. Яичков, А.Л. Хохлов, М.К. Корсаков, Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов, В.Е. Зайкова, О.Э. Лазаряни 508	Изучение экскреции 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида на крысах
И.А. Проскурина, Т.Е. Горская, Р.С. Ильин, Д.В. Горячев 521	Планирование программы клинических исследований лекарственных препаратов для очищения кишечника (обзор)
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРОИЗВОДСТВО	
И.Д. Касымов, А.Л. Марченко, А.В. Басевич 533	Разработка состава и технологии матричных таблеток этилтиобензимидазола fumarата в соответствии с заданным профилем высвобождения
Р.И. Лукашов, Н.С. Гурина, М.Н. Пovyдыш 541	Технология получения настойки и экстракта золотарника канадского травы (<i>Solidago canadensis</i>)
РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК	
В.М. Косман, М.В. Карлина, Н.М. Фаустова, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров 550	Вопросы валидации биоаналитических методик количественного определения биомаркеров: обзор нормативных документов
А.В. Митишев, Е.Е. Курдюков, М.Г. Макарецва, Я.М. Немова, Д.Г. Елистратов, А.С. Паксяев 565	Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве гречихи красностебельной (<i>Fagopyrum rubricaulis</i>) методом спектрофотометрии
А.Ю. Фисюк, О.В. Мушкина, Н.С. Голяк, О.А. Ёршик 574	Качественный анализ листьев валерианы лекарственной методом тонкослойной хроматографии
КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	
М.В. Рощина, Н.Г. Сахно, О.В. Гунар 583	Контроль стерильности высокотехнологичных лекарственных препаратов: влияние питательной среды, времени анализа и количества образца
Е.А. Смирязин, О.Г. Корнилова, В.Л. Багирова 595	Определение содержания примеси гистамина в биологических лекарственных средствах: перспективы перехода от методов <i>in vivo</i> к методам <i>in vitro</i>

Contents

Volume 15, No. 5 2025

MAIN TOPIC:	
	LIFE CYCLE OF A MEDICINE
V.L. Bagirova	492 Role of Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products in Setting Current Pharmacopoeial Requirements
	PREPARING REGISTRATION DOCUMENTS
E.I. Morkovin, E.Yu. Sorokina, A.G. Solodovnikov, D.V. Kurkin, A.A. Selezneva, S.A. Leshkova, A.V. Zaborovsky	497 Readability Testing as a Tool to Assess the Understanding of Medical Terms Used in Package Leaflets
	PRECLINICAL AND CLINICAL STUDIES
I.I. Yaichkov, A.L. Khokhlov, M.K. Korsakov, N.N. Volkhin, S.S. Petukhov, V.E. Zaykova, O.E. Lazariants	508 Excretion Study of 5-[5-(Trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide in Rats
I.A. Proskurina, T.E. Gorskaya, R.S. Ilin, D.V. Goryachev	521 Planning Clinical Trial Programme for Bowel Cleansing Medicinal Products (Review)
	PHARMACEUTICAL PRODUCTION
I.D. Kasymov, A.L. Marchenko, A.V. Basevich	533 Developing Composition and Technology of Ethylthiobenzimidazole Fumarate Matrix Tablets According to Specified Release Profile
R.I. Lukashou, N.S. Gurina, M.N. Povydysh	541 Production Process of Canada Goldenrod Herb (<i>Solidago canadensis</i>) Tincture and Extract
	ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION
V.M. Kosman, M.V. Karlina, N.M. Faustova, M.N. Makarova, V.G. Makarov	550 Validating Bioanalytical Methods for Biomarker Quantitation: A Regulatory Document Review
A.V. Mitishev, E.E. Kurdyukov, M.G. Makartseva, Ya.M. Nemova, D.G. Elistratov, A.S. Paksyaev	565 Development and Validation of an Analytical Procedure for the Quantitative Determination of Total Flavonoids in Red-Stem Buckwheat Herb (<i>Fagopyrum rubricaulis</i>) by Spectrophotometry
A.Yu. Fisiuk, O.V. Mushkina, N.S. Golyak, O.A. Yorshyk	574 Qualitative Analysis of <i>Valeriana officinalis</i> leaf by Thin-Layer Chromatography
	QUALITY CONTROL
M.V. Roshchina, N.G. Sakhno, O.V. Gunar	583 Sterility Control of Advanced Therapy Medicinal Products: Impact of Growth Medium, Analysis Time, and Sample Quantity
E.A. Smiryagin, O.G. Kornilova, V.L. Bagirova	595 Identifying Histamine Impurity in Biological Products: Prospective Transition from <i>in vivo</i> to <i>in vitro</i> Methods



Валерия БАГИРОВА:
«Фармакопея — динамичный инструмент,
требующий постоянного обновления в ответ
на вызовы фармацевтической отрасли»

Valeria BAGIROVA:
“Pharmacopoeia is a robust tool that demands updates
in response to pharmacy challenges”

В.Л. Багирова

Роль ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в формировании современных фармакопейных требований

*Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация*

✉ **Багирова Валерия Леонидовна;** bagirova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Государственная фармакопея является стратегическим документом, определяющим стандарты качества и безопасности лекарственных средств в России. Ее современное развитие неразрывно связано с деятельностью ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. В эксклюзивном интервью директор Института фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств, доктор фарм. наук, профессор Валерия Леонидовна Багирова рассказывает о ключевых вехах этого пути. Особое внимание в беседе уделяется гармонизации российских требований с нормами Фармакопеи ЕАЭС и ведущих мировых фармакопей. Активная международная кооперация и более 45% новых статей в XV издании российской фармакопеи демонстрируют динамичное развитие фармакопеи. Это интервью наглядно показывает, как формируется единое фармакопейное пространство для обеспечения пациентов качественными и безопасными лекарственными препаратами.

Ключевые слова: фармакопея; гармонизация; стандартизация; регуляторные органы; Научный центр экспертизы средств медицинского применения; НЦЭСМП

Для цитирования: Багирова В.Л. Роль ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в формировании современных фармакопейных требований. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2025;15(5):492–496. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-5-492-496>

Valeria L. Bagirova

Role of Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products in Setting Current Pharmacopoeial Requirements

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Valeria L. Bagirova; bagirova@expmed.ru

ABSTRACT

The State Pharmacopoeia is a strategic document that stipulates safety and quality standards in Russia. Its current progress directly correlates with the functioning of Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Ministry of Health of the Russian Federation). Valeria L. Bagirova, Dr.Sci. (Pharm.), Professor, Director of Institute of Pharmacopoeia and Medicinal Product Standardisation, follows the key milestones in her exclusive interview. It places special emphasis on harmonisation of Russian provisions with the EAEU Pharmacopoeia and the leading world pharmacopoeias. Active international cooperation and over 45% of new monographs in edition XV confirm the dynamic development of the pharmacopoeia. The interview demonstrates the creation of a common pharmacopoeial area that would provide the patients with high-quality and safe medicinal products.

Keywords: pharmacopoeia; harmonisation; standardisation; regulatory authority; Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products; SCEEMP

For citation: Bagirova V.L. Role of Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products in setting current pharmacopoeial requirements. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(5):492–496. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-5-492-496>

– Уважаемая Валерия Леонидовна, как бы Вы оценили роль Государственной фармакопеи в глобальном масштабе? Какие ключевые нововведения и вехи ее развития Вы бы выделили?

Государственная фармакопея занимает центральное место в системе стандартизации лекарственных средств, лекарственного растительного сырья и вспомогательных веществ. Почему? Потому что фармакопейные требования к качеству лекарственных препаратов являются обязательными для всех субъектов обращения лекарственных средств.

Государственная фармакопея Российской Федерации – это уникальный документ, без которого фармацевтическая отрасль в принципе существовать не может. Не случайно история отечественной фармакопеи насчитывает более 200 лет, и каждый ее этап отражал вызовы времени. Первая официальная государственная фармакопея в России была издана еще при Екатерине II в 1778 году на латинском языке. Но если первые издания были сосредоточены преимущественно на лекарствах растительного происхождения и содержали прописи по их изготовлению, то сегодня Государственная фармакопея – это сложная система стандартов,

отвечающая мировым требованиям к качеству лекарственных средств.

Фармацевтическая отрасль развивается динамично, и мы видим, что российская фармакопея XV издания претерпела значительные изменения по сравнению с предыдущими выпусками. Пожалуй, одним из самых наглядных фактов, свидетельствующих о большой работе по развитию российской фармакопеи и приближении ее подходов и требований к надлежащему уровню, является высокая доля статей, которые были введены впервые – более 45%.

Важнейшим шагом в ее современном развитии стало создание в 2021 году Института фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств в структуре ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (далее – ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России). Это позволило консолидировать экспертный потенциал и выстроить системную работу по разработке и актуализации общих фармакопейных статей (ОФС) и фармакопейных статей (ФС).

К деятельности по развитию Государственной фармакопеи мы подходим комплексно, чтобы

процесс разработки ОФС и ФС был эффективным и прозрачным.

Во-первых, в 2021 году был внедрен многостадийный алгоритм разработки ОФС и ФС, основанный на принципах научной обоснованности, коллегиальности, открытости и широкого вовлечения профессионального сообщества в этот процесс. Первоначально проекты ОФС и ФС разрабатываются Институтом фармакопеи и рассматриваются на специализированных экспертных секциях, в работе которых принимают участие представители производителей лекарственных средств, контрольно-аналитических лабораторий, научных и образовательных организаций. Состав секций регулярно обновляется и в настоящее время насчитывает более 200 специалистов – профессионалов в сфере стандартизации и контроля качества лекарственных средств. Далее одобренные на заседаниях секций статьи выносятся на рассмотрение Фармакопейного комитета ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, после чего размещаются в открытом доступе на 30 дней на официальном сайте Минздрава России и форуме Государственной фармакопеи с целью получения замечаний и предложений от всех заинтересованных лиц. Наконец, проекты ОФС и ФС направляются на рассмотрение в Совет Минздрава России по Государственной фармакопее, проходят научное и техническое редактирование, и только после этого издается приказ об утверждении ОФС и ФС, содержащий в том числе дату введения статей в действие и дату приведения нормативной документации / нормативного документа по качеству в соответствие с обновленными требованиями статей. Считаю, что этот многоступенчатый процесс позволяет избежать случайных ошибок и обеспечивает качество документа.

Во-вторых, мы способствуем совершенствованию нормативно-правового регулирования процесса разработки ОФС и ФС для Государственной фармакопеи. Наши сотрудники принимали активное участие в подготовке предложений по уточнению ключевых определений и терминов в Федеральном законе № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Благодаря этой работе определения ОФС и ФС были распространены на вспомогательные вещества и лекарственное растительное сырье, что позволило расширить номенклатуру соответствующих статей и охватить более широкий круг материалов и сырья, используемых в производстве лекарственных препаратов.

В-третьих, в 2024 году приказом Минздрава России № 468н был утвержден обновленный Порядок разработки ОФС и ФС, который

уточняет круг лиц, имеющих право вносить предложения по содержанию ОФС и ФС, и прямо указывает на необходимость учета положений Фармакопеи Евразийского экономического союза (ЕАЭС) при разработке ОФС и ФС для российской фармакопеи.

Наконец, в 2023 году был запущен форум Государственной фармакопеи, о нем я чуть выше уже сказала – специализированный портал, на котором размещены актуальная редакция Государственной фармакопеи XV издания, проекты ОФС и ФС для общественного обсуждения, а также регламентирующие документы. Форум имеет очень удобный функционал поиска необходимой информации по названиям, номерам и содержанию ОФС и ФС. Это значительно расширило возможности всех заинтересованных лиц для их участия в разработке российской фармакопеи, повысило прозрачность нашей работы и вовлеченность представителей отрасли в этот процесс. Хочу выразить благодарность всем коллегам, кто активно помогает нам в этой работе: обратная связь от производителей и научного сообщества бесценна.

– В условиях глобализации мирового фармацевтического рынка одним из основных векторов развития современных фармакопейных требований является их гармонизация. Как это отражается на Государственной фармакопее?

Формирование межгосударственных объединений и союзов, а также создание региональных рынков обусловили необходимость гармонизации фармакопейных требований. Именно наличие унифицированных требований к качеству лекарственных средств позволяет ускорить вывод лекарственных средств на рынок. Речь идет не только о гармонизации методов контроля, но и о создании единых подходов к стандартизации инновационных продуктов, таких как биотехнологические препараты, лекарственные средства на основе клеток и генной терапии.

Таким образом, цель гармонизации – обеспечить единые и прозрачные «правила игры», которые способствуют как выводу российских лекарственных средств на зарубежные рынки, так и появлению в России инновационных зарубежных препаратов.

Достижение этой цели предусматривает не только актуализацию существующих и разработку новых фармакопейных статей, но и гармонизацию номенклатуры статей. В целом гармонизация положений фармакопей подразумевает обеспечение идентичности их подходов и требований, но при этом допускаются отдельные различия

и особенности при наличии весомых причин, а также серьезного научного обоснования.

Вместе с тем Государственная фармакопея, являясь национальной, тесно связана с Фармакопеей ЕАЭС и гармонизируется с ней, что повышает эффективность функционирования единого рынка обращения лекарственных средств на пространстве Евразийского союза. Однако процесс гармонизации носит отнюдь не односторонний характер: при необходимости российская сторона инициирует актуализацию действующих и разработку новых статей Фармакопеи ЕАЭС. В целом российской стороной было разработано более 100 ОФС для 4-й части I тома Фармакопеи ЕАЭС, выпуск которой ожидается до конца 2025 года.

Основополагающими документами, определяющими подходы к гармонизации, являются Концепция гармонизации фармакопей государств – членов ЕАЭС (2015 г.), которая определяет приоритетные для целей гармонизации зарубежные фармакопеи, а также Стратегия развития Фармакопеи ЕАЭС на 2024–2035 гг., которая устанавливает ключевые цели и направления развития Фармакопеи ЕАЭС на ближайшие 10 лет и содержит расширенный перечень иностранных фармакопей для целей гармонизации, включающий Фармакопею Китайской Народной Республики, Индийскую фармакопею и Африканскую фармакопею.

– Следовательно, для достижения фармакопеей современного уровня важен не только высокий профессионализм ее разработчиков, но и взаимодействие с коллегами из других государств?

Совершенно верно. Повторю, что процесс разработки и актуализации статей для Государственной фармакопеи основывается на принципах научной обоснованности, коллегиальности и открытости, в том числе на международном уровне. Иными словами, создание современной фармакопеи практически невозможно без обмена опытом с нашими зарубежными коллегами.

В рамках ЕАЭС представители Научного центра, в том числе сотрудники Института фармакопеи, принимают активное участие в работе Фармакопейного комитета ЕАЭС и его специализированных рабочих групп. Мы также участвуем в Международных встречах мировых фармакопей (IMWP) под эгидой Всемирной организации здравоохранения, что позволяет делиться опытом стандартизации фармацевтической продукции и внедрять наиболее перспективные подходы и практики.

Помимо совместной работы на различных площадках, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

также активно взаимодействует с зарубежными коллегами на двусторонней основе, в том числе в соответствии с меморандумами о взаимопонимании, заключенными с Индийской фармакопейной комиссией, китайскими коллегами из Пекинского института по контролю лекарственных средств и Института России Университета Цинхуа.

– Валерия Леонидовна, расскажите, пожалуйста, какие направления развития стандартизации являются приоритетными для Государственной фармакопеи в настоящее время с учетом специфики российской фармацевтической отрасли?

Стремление к полному охвату наиболее значимых для системы здравоохранения лекарственных средств – это один из базовых принципов разработки фармакопейных требований. Как и большинство национальных фармакопей, Государственная фармакопея Российской Федерации развивается по нескольким ключевым направлениям.

Во-первых, одним из ключевых приоритетов является разработка ФС на фармацевтические субстанции для наиболее востребованных лекарственных препаратов, которые включены в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов и которые в скором времени войдут в Перечень стратегически значимых лекарственных средств.

Во-вторых, увеличивается количество ОФС и ФС, регламентирующих качество биологических лекарственных средств, радиофармацевтических лекарственных препаратов, лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов, лекарственных препаратов аптечного изготовления и вспомогательных веществ.

Так, в XV издании Государственной фармакопеи впервые введен раздел с ФС на вспомогательные вещества, содержащий 13 статей; раздел с ФС на лекарственное растительное сырье включает 50 статей, из которых 27 введены впервые. Также впервые разработаны 32 ФС на конкретные радиофармацевтические лекарственные препараты и введен раздел с 77 ФС на лекарственные препараты аптечного изготовления часто встречающихся прописей.

Другим важным направлением является внедрение принципов этичного обращения с животными. В рамках Программы по внедрению Концепции 3R мы разрабатываем методы, позволяющие сократить или заменить испытания на животных, включая научные исследования по разработке новых селективных методик контроля. К примеру, разработана

методика высокоэффективной жидкостной хроматографии для контроля сердечных гликозидов. Ее включение в Государственную фармакопею позволит постепенно заменить методику, предусматривающую использование лягушек для контроля лекарственных растительных препаратов, содержащих сердечные гликозиды. К включению в Государственную фармакопею также запланирована ОФС, содержащая методики контроля примесей этиленгликоля и диэтиленгликоля в лекарственных препаратах, а также ОФС с новой инструментальной методикой контроля гистамина в лекарственных средствах.

Программой также предусмотрена разработка ряда обновленных ОФС и ФС, аттестация фармакопейных стандартных образцов и разработка методических документов и рекомендаций.

– Принимая во внимание значительный объем Государственной фармакопеи XV издания, включающей более 1000 статей, важность методической работы очевидна. Каковы ваши рекомендации по более эффективному применению Государственной фармакопеи?

Круг пользователей Государственной фармакопеи чрезвычайно широк, он включает в себя разработчиков, производителей, изготовителей и поставщиков лекарственных средств, лаборатории контроля качества, регуляторные и экспертные органы, научные и образовательные учреждения, фармацевтические ассоциации. Поэтому при начале работы с Государственной фармакопеей на специальном портале (<https://pharmacopoeia.regmed.ru/>) в первую очередь следует изучить структуру сайта и его навигацию, прочитать вводную часть самого XV издания, в том числе предисловие и введение, а также ознакомиться с одним из ключевых документов – базовой ОФС.1.1.0001 «Общие положения».

В помощь всем пользователям мы также разработали методические рекомендации «Правила применения общих фармакопейных статей и фармакопейных статей Государственной фармакопеи Российской Федерации». Этот документ, помимо правил применения статей, содержит обзор ключевых понятий, алгоритм разработки ОФС и ФС, а также основные отличия XV издания от предыдущих. В ближайшее время эти рекомендации будут опубликованы в заключительном, 3-м томе Руководства по экспертизе лекарственных средств «Экспертиза качества и безопасность лекарственных средств», издаваемом ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

– Валерия Леонидовна, можно ли сказать, что работа над Государственной фармакопеей Российской Федерации закончена и можно поставить точку?








Правильнее сказать так: работа продолжается. Стремительное развитие фармацевтической науки и промышленности, разработка новых молекул действующих веществ, совершенствование состава лекарственных препаратов, расширение номенклатуры лекарственных форм требуют наличия единых стандартов качества лекарственных препаратов, растительного лекарственного сырья и вспомогательных веществ. Решение такой сложной задачи невозможно без привлечения компетенций всей фармацевтической отрасли и научного сообщества. Роль ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в целом и Института фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств в частности в этом процессе очень велика. Она заключается в определении наиболее востребованных и перспективных направлений стандартизации фармацевтической продукции, разработке современных методик и их внедрении в отечественную фармакопейную практику и, наконец, в освоении передовых мировых подходов к созданию и развитию фармакопеи.

Государственная фармакопея – это живой организм, призванный реагировать на происходящие в отрасли процессы. Пример тому – общая фармакопейная статья ОФС.1.2.2.2.0031 «Определение примесей *N*-нитрозаминов», которая разработана в связи с обнаружением данных генотоксичных примесей в ряде лекарственных средств и вводится в практику отечественного фармакопейного анализа впервые.

Вместе с тем мы высоко ценим вклад всех специалистов и организаций, которые принимают активное участие в развитии фармакопеи, и признательны нашим зарубежным коллегам за результативное и взаимовыгодное сотрудничество как на пространстве ЕАЭС, так и на других международных площадках.

Мы осознаем всю важность этой работы и убеждены в том, что фармакопея, содержащая современные требования и применяющая передовые подходы, призвана не только обеспечивать высокие стандарты качества сегодня, но и определять тенденции развития стандартизации на ближайшую и среднесрочную перспективу, внося свой вклад как в развитие фармацевтической отрасли, так и в укрепление технологического суверенитета нашей страны.



Е.И. Морковин^{1,2,3}  
Е.Ю. Сорокина¹ 
А.Г. Солодовников^{1,4} 
Д.В. Куркин³ 
А.А. Селезнева³ 
С.А. Лешкова³,
А.В. Заборовский³ 

Пользовательское тестирование как способ оценки понимания медицинских терминов, используемых в листках-вкладышах

¹ Общество с ограниченной ответственностью «Статэндокс»,
Раменский б-р, д. 1, вн. тер. г. муниципальный округ Раменки, Москва,
119607, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Волгоградский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
площадь Павших Борцов, д. 1, г. Волгоград, 400131, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский университет медицины» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
ул. Долгоруковская, д. 4, Москва, 127006, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Российский университет дружбы народов»,
ул. Миклухо-Маклая, д. 6, Москва, 117198, Российская Федерация

✉ Морковин Евгений Игоревич; emorkovin@statandocs.com

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Информация, предназначенная для пациента и включаемая в листок-вкладыш к лекарственному препарату, должна обеспечивать возможность эффективного и безопасного применения препарата за счет соответствующих разъяснений, однако объем необходимых разъяснений и необходимость введения определений для каждого из используемых терминов не ясны.

ЦЕЛЬ. Оценка понимания случайных медицинских терминов из утвержденных инструкций по медицинскому применению лекарственных препаратов, зарегистрированных в Российской Федерации, респондентами, не имеющими медицинского образования, которые могут потенциально соответствовать целевой популяции пациентов; статистическая оценка связи демографических характеристик популяции с результатами тестирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Тестирование проводили на платформе Google Forms. Из глоссария были выбраны 11 случайных терминов, использовавшихся в утвержденных инструкциях по медицинскому применению лекарственных препаратов, зарегистрированных в России. Статистический анализ понятности проводили для 63 респондентов, о которых были собраны демографические данные, включающие возраст и уровень образования.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Для некоторых медицинских терминов было выявлено завышение внутренней оценки понятности: респонденты считали термин понятным, но давали ему неверное определение. Всем протестированным терминам респонденты давали верное определение менее чем в 80% случаев; наиболее понятными терминами оказались «ринит» (66,1% оценщиков), «ангионевротический отек» (28,6%), «экзантема» (25,0%) и «анурия» (25,0%). Лица с высшим образованием, а также те, кто работает с документами, чаще давали правильное определение термину.

ВЫВОДЫ. При разработке листов-вкладышей, содержащих любые медицинские термины, независимо от того, насколько частым является их употребление за пределами медицинских учреждений, важно учитывать неоднородность









характеристик целевой аудитории, обусловленную в числе прочего различиями в уровне образования. Термины, которые вызывают наибольшие трудности в понимании при пользовательском тестировании, должны быть дополнительно пояснены или заменены на более понятные синонимы.

Ключевые слова: медицинская терминология; листок-вкладыш; пользовательское тестирование; опрос; демографические характеристики; применение лекарственных средств

Для цитирования: Морковин Е.И., Сорокина Е.Ю., Солодовников А.Г., Куркин Д.В., Селезнева А.А., Лешкова С.А., Заборовский А.В. Пользовательское тестирование как способ оценки понимания медицинских терминов, используемых в листовках-вкладышах. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(5):497–507. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-717>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Evgeny I. Morkovin^{1,2,3}  
Ekaterina Yu. Sorokina¹ 
Alexander G. Solodovnikov^{1,4} 
Denis V. Kurkin³ 
Alisa A. Selezneva³ 
Sofya A. Leshkova³ 
Andrey V. Zaborovsky³ 

Readability Testing as a Tool to Assess the Understanding of Medical Terms Used in Package Leaflets

¹ Statandocs LLC,
1 Ramensky Blvd, Intracity Territory of a Federal City, Ramenki District,
Moscow 119607, Russian Federation

² Volgograd State Medical University,
1 Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd 400131, Russian Federation

³ The Russian University of Medicine,
4 Dolgorukovskaya St., Moscow 127006, Russian Federation

⁴ Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba,
6 Miklukho-Maklay St., Moscow 117198, Russian Federation

✉ Evgeny I. Morkovin; emorkovin@statandocs.com

ABSTRACT

INTRODUCTION. The information that is intended for a patient and included in the package leaflet for a medicinal product should ensure the effective and safe use of the medicinal product through appropriate explanations. However, the appropriate level of detail and the necessity of defining each medical term are not clear.

AIM. This study aimed to test how respondents without medical education, potentially representative of the general patient population, understand medical terms randomly selected from approved package leaflets for medicinal products authorised in the Russian Federation, as well as to conduct a statistical analysis of the relationships between the respondents' demographics and test results.

MATERIALS AND METHODS. A Google Forms-based comprehension test evaluated the understanding of 11 random terms from approved package leaflets for medicinal products authorised in the Russian Federation. The statistical analysis of comprehension included data from 63 respondents. The study collected the respondents' demographic characteristics, including their level of education and age.

RESULTS. The respondents overestimated their comprehension of medical terms, giving incorrect definitions to some terms that they previously deemed to be comprehensible. Overall, the respondents provided correct definitions for less than 80% of the terms tested. The most comprehensible terms were "rhinitis" (66.07%), "angioedema" (28.57%), "exanthema" (25.00%), and "anuria" (25.00%). Those who had a higher education or worked with documents were more likely to define the terms correctly.

CONCLUSIONS. Package leaflets containing medical terms, regardless of how frequently these terms are used outside of healthcare settings, should be de-

signed taking into account the heterogeneity of the target audience due to, among other things, differences in education. The terms that cause the greatest difficulty in user testing should be further explained or replaced with more understandable synonyms.

Keywords: medical terminology; survey; package leaflet; patient information leaflet; readability testing; demographic characteristics; use of medicines

For citation: Morkovin E.I., Sorokina E.Yu., Solodovnikov A.G., Kurkin D.V., Selezneva A.A., Leshkova S.A., Zaborovsky A.V. Readability testing as a tool to assess the understanding of medical terms used in package leaflets. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(5):497–507. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-717>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Потребность в разработке инструкции по медицинскому применению (ИМП) лекарственного препарата в форме листка-вкладыша (ЛВ), предназначенного непосредственно для пациента, обсуждалась за рубежом с конца 1960-х гг. [1], однако обязательными документы такого типа стали лишь в конце 1990-х гг. со вступлением в силу соответствующей директивы Совета Европейского союза¹. Основным документом, содержащим полную информацию о лекарственном препарате, является предназначенная для специалиста общая характеристика лекарственного препарата, в то время как ЛВ должен включать в себя только информацию об идентификации лекарственного препарата, показаниях к применению, мерах предосторожности, способе применения и режимах дозирования, возможных нежелательных реакциях и условиях хранения. Ключевым требованием к ЛВ является необходимость его представления на языке, лишенном специальной терминологии и понятном для потребителей, не имеющих специального образования. Это условие необходимо для устранения барьеров, препятствующих пониманию текста пациентами, чтобы найти необходимую информацию и действовать соответственно сложившейся клинической ситуации [2]. Таким образом, возникла необходимость совершенствования ЛВ для адаптации его под нужды пациентов с различным уровнем медицинской грамотности с учетом баланса между полной представлением информации и пониманием смысла итогового документа. Для этого была разработана процедура пользовательского тестирования (ПТ) [3]. Концепция ПТ впервые появилась в 1990-х гг. в Австралии [4], затем была

имплементирована в право Европейского союза и в настоящее время – в право Евразийского экономического союза (ЕАЭС).

ПТ проводят в целях обеспечения понятности и легкости восприятия ИМП – ЛВ. ПТ, как и другие формы консультации с пациентами, обеспечивает учет мнения пациентов о содержании, удобстве и понятности ЛВ, что позволяет сформировать итоговый ЛВ, позволяющий большинству потребителей лекарственного препарата принимать безопасные и правильные решения о его применении. Согласно Требованиям по подготовке текста ИМП лекарственного препарата², проведение ПТ или аналогичного тестирования ЛВ необходимо предусмотреть в случаях, когда регистрации подлежат:

- лекарственные препараты, содержащие новые химические соединения или выпускаемые в принципиально новых лекарственных формах;
- лекарственные препараты после изменения условий их отпуска;
- лекарственные препараты, в ранее протестированный ЛВ которых внесены значимые новые сведения по безопасности (добавление большого количества новых клинических рекомендаций в объеме, превышающем единичные слова или фразы вследствие ограничений в связи с безопасностью, включение новых популяций пациентов как следствие расширения показаний к применению препарата).

Для ЛВ безрецептурных препаратов также применяют специальные требования, поскольку в соответствии с п. 23–25 Правил определения категорий лекарственных препаратов, отпускаемых

¹ European Union Council Directive 92/27/EEC of 31 March 1992 on the labelling of medicinal products for human use and on package leaflets. <http://data.europa.eu/eli/dir/1992/27/oj>

² Приложение № 12 к Решению Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 88 «Об утверждении требований к инструкции по медицинскому применению лекарственного препарата и общей характеристике лекарственного препарата для медицинского применения».

без рецепта и по рецепту³, пациент «...должен быть способен самостоятельно оценить состояние или симптом, по поводу которого применяется безрецептурный препарат, и суметь применить его без медицинского наблюдения; ...исключить похожие состояния, для лечения которых безрецептурный препарат не применяется; ...правильно оценивать естественное течение заболевания или состояния, длительность симптомов, возможность и возникновение рецидивов заболевания и их последствия; ...правильно интерпретировать имеющиеся в ИМП (ЛВ) противопоказания, лекарственные взаимодействия, меры предосторожности и предупреждения. При этом следует учитывать, подтверждена ли эта способность результатами потребительского тестирования ИМП (ЛВ)». По указанным причинам информация, предназначенная для пациента, составляется таким образом, чтобы обеспечить возможность эффективного и безопасного применения препарата пациентом за счет соответствующих разъяснений, понятность которых следует подтвердить результатами ПТ.

Аналогичные требования могут применяться не только к безрецептурным препаратам, в том числе имеющим длительный опыт безопасного и эффективного применения у человека, но и к рецептурным препаратам, а также к препаратам, не предназначенным для самостоятельного использования пациентом, поскольку в соответствии с Приложениями № 16 и 21 к Правилам регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения⁴ введение препарата только в больничных условиях, введение только медицинским специалистом, соответствие шаблонам документов по проверке качества и изученное применение препарата в течение длительного времени считаются неприемлемыми обоснованиями для отсутствия ПТ.

Таким образом, независимо от типа препарата и соответствия его ЛВ актуальным требованиям ПТ является инструментом, призванным оценить качество макета ЛВ, предназначенного для сопровождения препарата. ЛВ выступает в качестве источника информации, которую пациент может и должен использовать, участвуя

в принятии решения по поводу применения препаратов, назначенных или рекомендованных медицинскими работниками. ЛВ составляют на основе общей характеристики лекарственного препарата, однако, в соответствии с Требованиями по подготовке текста ИМП лекарственного препарата⁵, ЛВ должен быть написан доступным языком, так как сложное изложение и медицинская терминология затрудняют понимание пациентами информации [5].

Следовательно, вся информация в ЛВ должна быть подготовлена на языке, понятном неспециалисту, например, не допускается использовать системно-органную классификацию нежелательных реакций, которая может вызывать трудности понимания или интерпретации у пациентов. Во всех случаях необходимыми представляются дополнительные объяснения и перефразирования, с помощью которых используемая терминология должна стать понятной лицам без медицинского образования. Это не означает, что медицинские термины должны быть полностью исключены из ЛВ. В частности, Рекомендации по составлению проекта ЛВ, опубликованные ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России⁶, содержат указания, что необходимо соблюсти преемственность объяснения терминов, приводя сначала непрофессиональное описание, а затем соответствующий медицинский термин. В последующем по всему тексту ЛВ для достижения удобочитаемости допускается использовать наиболее подходящий из использованных вариантов (непрофессиональный или медицинский).

Однако масштабы необходимых разъяснений для большей части медицинских терминов неясны. Многие из этих терминов используются в обиходе, в том числе и в переносных значениях, поэтому они кажутся безусловно понятными даже для лиц без медицинского образования, в то же время не давая фактического представления об истинном значении термина (например, о симптомах конкретного заболевания, его тяжести и возможных последствиях) [6–8].

Установленная процедура ПТ не предполагает проверку каждого термина, и время, отводимое на ПТ, ограничено для того, чтобы избежать

³ Решение Коллегии ЕЭК от 29.12.2015 № 178 «О Правилах определения категорий лекарственных препаратов, отпускаемых без рецепта и по рецепту».

⁴ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

⁵ Приложение № 12 к Решению Совета ЕЭК от 3.11.2016 № 88 «Об утверждении требований к инструкции по медицинскому применению лекарственного препарата и общей характеристике лекарственного препарата для медицинского применения».

⁶ Рекомендации по составлению проекта листка-вкладыша. <https://www.regmed.ru/activity/zaya/>

усталости респондентов, поэтому в рамках ПТ, как правило, используют 12–13 вопросов, относящихся к ключевой информации из ЛВ. Результат тестирования считается приемлемым, если 90% респондентов способны найти запрошенную информацию в ЛВ и 90% из них смогут продемонстрировать понимание этой информации. То есть при тестировании в группе из 20 респондентов 16 из них должны быть способны найти и понять всю запрошенную информацию. Следовательно, необходимым условием для улучшения практики подготовки ЛВ становится аккумуляция данных о результатах ПТ различных ЛВ, в том числе за счет улучшения прозрачности методологии ПТ и публикации соответствующих протоколов [9], а также за счет проведения дополнительных исследований, направленных на оценку медицинской грамотности пациентов [2].

Цель работы – оценка понимания случайных медицинских терминов из утвержденных инструкций по медицинскому применению лекарственных препаратов, зарегистрированных в Российской Федерации, респондентами, не имеющими медицинского образования, которые могут потенциально соответствовать целевой популяции пациентов; статистическая оценка связи демографических характеристик популяции с результатами тестирования (внутренней и внешней оценкой правильности описания термина респондентами).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опрос был проведен на платформе Google Forms, пилотные результаты собраны с 26.01.2023 по 29.01.2023. Подготовленный опросник был анонимным и не включал графы, предназначенные для сбора персональных данных, поэтому на полученные результаты не распространялось действие Федерального закона «О персональных данных» от 27.07.2006 № 152-ФЗ.

Разработанная форма состояла из 3 разделов:

- демографические данные: пол, возраст, наличие высшего образования, связь работы с медицинской или фармацевтической деятельностью, наличие работы, связанной с подготовкой или чтением документов, индивидуальные предпочтения и потребности в приеме лекарственных препаратов;
- внутренняя оценка понятности медицинских терминов, проводившаяся при помощи дихотомических вопросов вида «Понятен ли Вам термин “термин”?» – «Да/Нет»;

- открытые вопросы с предложением объяснить ранее использованный термин («Как Вы понимаете термин “термин”?»), ответы на которые оценивались медицинским экспертом.

Перечень терминов, требовавших пояснений, был составлен путем рандомизированного выбора 11 терминов из глоссария, содержащего на момент подготовки опросника 150 терминов, использующихся в утвержденных ЛВ лекарственных препаратов, доступных в Государственном реестре лекарственных средств Российской Федерации⁷. В итоговый перечень вошли следующие термины: фотосенсибилизация, диплопия, ангионевротический отек, диспепсия, анурия, мелена, пустулез, ринит, тахифилаксия, парестезия, экзантема.

При расчете выборки, основанном на том, что допустимая погрешность составит 10%, уровень надежности – 95%, доля непонятных терминов для генеральной совокупности – 9,1% (непонятность как минимум одного термина из 11 предложенных), необходимый размер выборки оценивался в 32 респондента. С учетом предположения, что 1/3 заполненных форм окажутся невалидными (т.е. не будут содержать значимую для анализа информацию о демографических данных и (или) будут заполнены частично или с ошибками), необходимый объем выборки должен был составить не менее 49 респондентов. Поэтому с учетом округления был запланирован предварительный анализ после получения не менее 50 заполненных форм. Выгрузка данных для анализа была произведена однократно в таблицу формата .xlsx (Microsoft Excel). Статистический анализ выполняли при помощи программы GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). Для описания количественных характеристик (возраст) использовали среднее арифметическое значение и стандартное отклонение (при нормальном распределении данных), медиану и интерквартильный размах (при распределении, отличавшемся от нормального), минимальное и максимальное значение. Для описания качественных характеристик использовали количество наблюдений (n) и долю от общего количества наблюдений (%). Соответствие количественных данных нормальному распределению определяли по критерию Шапиро–Уилка. Статистическую значимость различий количественных характеристик предполагалось оценивать при помощи критерия Стьюдента (при нормальном распределении данных) или Уилкоксона (при распределении, отличавшемся от нормального); для оценки

⁷ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.minzdrav.gov.ru>

различий качественных характеристик использовали точный тест Фишера. Корреляционный анализ выполняли с использованием коэффициента Пирсона (для дихотомических данных – коэффициента ϕ) или коэффициента ранговой корреляции Спирмена (для данных, распределенных непараметрически).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На момент подготовки материалов для данной работы в опросе приняли участие 63 респондента в возрасте от 14 до 58 лет включительно. После исключения из опроса респондентов, не указавших значимые для анализа демографические данные (пол, возраст и (или) образование) или отметивших связь профессиональной деятельности с лекарственными препаратами, в анализируемую выборку были включены данные 56 респондентов (7 мужчин, 49 женщин), средний возраст которых составил $32,2 \pm 14,1$ года, из них 31 респондент сообщил о наличии высшего или неоконченного высшего образования, в то время как 25 респондентов не имели высшего образования (табл. 1). Таким образом, выборка оказалась в достаточной степени репрезентативной, поскольку доля невалидных анкет составила 11,1%, что было существенно ниже величины, заложенной при расчете, однако в выборке преобладали респонденты женского пола и респонденты, сообщившие о предпочтении не принимать лекарственные препараты.

Согласно результатам анализа письменных ответов респондентов суммарные внутренние оценки правильности были выше внешних (2,5 против 1,5, при уровне значимости $p = 0,0277$), и ни один

из терминов не был понятен более чем 80% респондентов (табл. 2).

Наиболее понятными терминами оказались «ринит» (66,1% оценщиков), «ангионевротический отек» (28,6%), «экзантема» (25,0%) и «анурия» (25,0%). Для трех терминов (диплопия, пустулез, парестезия) внешняя и внутренняя оценки полностью совпадали ($p = 1,0000$), однако для большинства других терминов внешние оценки оказались ниже внутренних, что свидетельствует о недостаточном понимании термина, хотя статистически значимое снижение оценки произошло только для термина «фотосенсибилизация» ($p = 0,0247$). В 2 случаях наблюдалось обратное: в знании термина «экзантема» были уверены 5 респондентов, однако удовлетворительное объяснение привели 14 респондентов ($p = 0,0420$); для термина «мелена» статистически значимые различия отсутствовали ($p = 1,000$), однако уверенность в знании этого термина высказали 4 респондента, в то время как объяснить этот термин получилось у 5 респондентов, причем только 2 из них исходно были уверены в его понимании.

Статистически значимая очень высокая положительная корреляция между внутренней уверенностью в понимании терминов и способностью к его объяснению наблюдалась для термина «анурия» (коэффициент корреляции $r = 0,751$, $p < 0,001$), высокие ($r = 0,50-0,74$) положительные корреляции – для терминов «диплопия», «диспепсия», «пустулез», «ринит» ($p < 0,001$ во всех случаях), слабые ($r = 0,25-0,49$) положительные – для терминов «ангионевротический отек», «мелена», «парестезия», а также для суммарных оценок ($p < 0,05$, табл. 3). Корреляции внутренних

Таблица 1. Исходные демографические характеристики респондентов

Table 1. Baseline demographic characteristics of respondents

Характеристика <i>Characteristic</i>	Значение (доля, %) <i>Value (n, %)</i>
Возраст, лет <i>Age, years</i>	$32,2 \pm 14,1^*$
Женский пол <i>Female sex</i>	49 (87,5)
Наличие высшего образования <i>Higher education</i>	31 (55,4)
Работа с документами <i>Work with documents</i>	32 (57,1)
Предпочтение по возможности не принимать лекарственные препараты <i>Preference not to take medication if possible</i>	40 (71,4)
Регулярный прием лекарственных препаратов <i>Regular medication</i>	24 (42,9)

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

* Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

* The data is presented as the mean \pm standard deviation.

Таблица 2. Анализ внутренней и внешней оценки понятности терминов

Table 2. Analysis of self-reported and external assessments of term comprehensibility

Термин <i>Term</i>	Число респондентов (доля, %) <i>Respondents (n, %)</i>		Число оценщиков (доля, %) <i>Evaluators (n, %)</i>		Уровень значимости <i>p</i> <i>p-value</i>
	Да <i>Yes</i>	Нет <i>No</i>	Да <i>Yes</i>	Нет <i>No</i>	
Фотосенсибилизация <i>Photosensitisation</i>	15 (26,8)	41 (73,2)	5 (8,9)	51 (91,1)	0,0247*
Диплопия <i>Diplopia</i>	6 (10,7)	50 (89,3)	6 (10,7)	50 (89,3)	1,0000
Ангионевротический отек <i>Angioedema</i>	25 (44,6)	31 (55,4)	16 (28,6)	40 (71,4)	0,1161
Диспепсия <i>Dyspepsia</i>	18 (32,1)	38 (67,9)	10 (17,9)	46 (82,1)	0,1258
Анурия <i>Anuria</i>	18 (32,1)	38 (67,9)	14 (25,0)	42 (75,0)	0,5307
Мелена <i>Melena</i>	4 (7,1)	52 (92,9)	5 (8,9)	51 (91,1)	1,0000
Пустулез <i>Pustulosis</i>	10 (17,9)	46 (82,1)	10 (17,9)	46 (82,1)	1,0000
Ринит <i>Rhinitis</i>	44 (78,6)	12 (21,4)	37 (66,1)	19 (33,9)	0,2047
Тахифилаксия <i>Tachyphylaxis</i>	7 (12,5)	49 (87,5)	3 (5,4)	53 (94,6)	0,3207
Парестезия <i>Paresthesia</i>	4 (7,1)	52 (92,9)	4 (7,1)	52 (92,9)	1,0000
Экзантема <i>Exanthema</i>	5 (8,9)	51 (91,1)	14 (25,0)	42 (75,0)	0,0420*
Верные ответы** <i>Correct answers**</i>	2,5 (1,00–3,75), от 0 до 9 <i>(from 0 to 9)</i>		1,5 (0,25–3,00), от 0 до 9 <i>(from 0 to 9)</i>		0,0277* (критерий Уилкоксона) <i>(Wilcoxon test)</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Да – верный ответ; Нет – неверный ответ.

* Статистически значимые различия внутренней и внешней оценок, полученных при анализе письменных ответов (если не указано иное, использован точный тест Фишера); ** данные представлены в виде медианы, интерквартильного размаха, минимального и максимального значения.

Note. “Yes”, correct answers; “No”, incorrect answers.

* Statistically significant differences between the self-reported comprehensibility assessment and the assessment obtained by analysing written answers (unless otherwise specified, Fisher’s exact test was used); and **, the data are presented as the median, interquartile range, and minimum and maximum values.

оценок понимания и внешних оценок правильности ответов для терминов «фотосенсибилизация», «тахифилаксия» и «экзантема» не были статистически значимыми. Это позволяет полагать, что три последних из перечисленных терминов с большей вероятностью могут ошибочно восприниматься респондентами, в частности, из-за их схожести с иными, более известными терминами (например, в паре «тахифилаксия» – «тахикардия»), что создает риск неправильной интерпретации соответствующих указаний в ЛВ, в то время как для иных терминов вероятность ошибочного восприятия ниже.

Ни один из демографических факторов не оказывал существенного влияния на внутренние оценки (табл. 4), в то время как оценки, полученные при анализе письменных ответов, слабо ($r < 0,3$) коррелировали с наличием высшего об-

разования и работой, связанной с документами ($p < 0,05$), а также с фактом регулярного приема лекарственных препаратов и возрастом (на уровне тенденции: $p \geq 0,05$, но $< 0,1$). Влияния пола респондентов на согласованность оценок не прослеживалось, что может быть вызвано преобладанием среди респондентов женщин (87,5%); предпочтение не принимать лекарственные препараты также не оказало заметного влияния на результаты, что, по-видимому, говорит о необходимости уточнения причин такого предпочтения в следующих опросах (например, в силу общих опасений о безопасности или из-за наличия опыта применения лекарственных препаратов с развитием серьезных нежелательных реакций).

Таким образом, социальные и демографические факторы, по-видимому, оказывают слабое влияние на понятность медицинских терминов

Таблица 3. Корреляция между внутренними и внешними оценками, полученными при анализе письменных ответов респондентов
Table 3. Correlation between self-reported assessments and external assessments obtained by analysing respondents' written answers

Термин <i>Term</i>	Коэффициент корреляции (r) <i>Correlation coefficient (r)</i>	Уровень значимости p <i>p-value</i>
Фотосенсибилизация <i>Photosensitisation</i>	0,235	0,081
Диплопия <i>Diplopia</i>	0,627	<0,001
Ангионевротический отек <i>Angioedema</i>	0,307	0,022
Диспепсия <i>Dyspepsia</i>	0,578	<0,001
Анурия <i>Anuria</i>	0,751	<0,001
Мелена <i>Melena</i>	0,399	0,002
Пустулез <i>Pustulosis</i>	0,635	<0,001
Ринит <i>Rhinitis</i>	0,545	<0,001
Тахифилаксия <i>Tachyphylaxis</i>	-0,090	0,510
Парестезия <i>Paresthesia</i>	0,462	<0,001
Экзантема <i>Exanthema</i>	0,253	0,060
Суммарная оценка <i>Total score</i>	0,472	<0,001

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

для лиц, не имеющих медицинского образования и (или) не связанных с медицинской и фармацевтической деятельностью. Все использованные в опросе термины требуют пояснения в ЛВ для надлежащего информирования потребителей о возможных нежелательных реакциях на лекарственные препараты.

Проведенный опрос носил пилотный характер, однако он позволил выявить приемлемость существующих онлайн-инструментов для сбора данных о понимании лицами без медицинского образования медицинских терминов, употребляемых при составлении ЛВ. В то же время полученные результаты следует интерпретировать с осторожностью, поскольку подобный способ проведения опроса не лишен недостатков, к которым, в частности, можно отнести:

- невозможность проверки правдивости внешних данных (социально-демографических сведений) и наличие пропусков данных;
- преимущественное получение ответов от респондентов женского пола, не позволяющее оценить возможные гендерные различия в понимании терминов;
- относительно низкую генерализуемость полученных результатов, обусловленную не-

возможностью оценить знания лиц, не использующих социальные сети и мессенджеры в повседневной деятельности;

- возможность использования поисковых систем для ответов на открытые вопросы или внесения заведомо неверных юмористических/саркастических ответов (что, однако, не прослеживалось по фактически полученным ответам);
- невозможность использования дополнительных вопросов для уточнения полученных ответов.

Частота правильных ответов для каждого из использованных в опросе терминов была существенно ниже 80%, что свидетельствует о том, что даже простые термины нельзя считать безусловно понятными для большинства лиц, профессионально не связанных с медицинской или фармацевтикой. Однако наблюдавшееся частичное или полное непонимание терминов (табл. 5) может приводить к неспособности пациентов своевременно распознать нежелательные реакции и оценить их тяжесть, что является одним из значимых условий при определении категории отпуска лекарственных препаратов⁸.

⁸ Решение Коллегии ЕЭК от 29.12.2015 № 178 «О Правилах определения категорий лекарственных препаратов, отпускаемых без рецепта и по рецепту».

Таблица 4. Корреляция между демографическими факторами и оценками понимания терминов

Table 4. Correlations between demographic factors and assessment of term comprehensibility

Факторы <i>Factors</i>	Внутренние оценки <i>Self-reported assessments</i>		Внешние оценки письменных ответов <i>External assessments of written answers</i>	
	Коэффициент корреляции (r) <i>Correlation coefficient (r)</i>	Уровень значимости p <i>p-value</i>	Коэффициент корреляции (r) <i>Correlation coefficient (r)</i>	Уровень значимости p <i>p-value</i>
Пол <i>Sex</i>	-0,063	0,645	-0,111	0,415
Возраст <i>Age</i>	0,056	0,681	0,235	0,081
Наличие высшего образования <i>Higher education</i>	0,011	0,937	0,269	0,045*
Работа с документами <i>Work with documents</i>	0,233	0,084	0,283	0,035*
Предпочтение по возможности не принимать лекарственные препараты <i>Preference not to take medication if possible</i>	-0,045	0,743	-0,083	0,545
Регулярный прием лекарственных препаратов <i>Regular medication</i>	0,053	0,699	0,262	0,051

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

* Статистически значимая корреляция ($p < 0,05$).

* Statistically significant correlation ($p < 0.05$).

Таблица 5. Примеры ответов респондентов

Table 5. Examples of respondents' answers

Термин <i>Term</i>	Ответы респондентов <i>Respondents' answers</i>
Фотосенсибилизация <i>Photosensitisation</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Повышенная чувствительность к свету / Светочувствительность / Чувствительность к свету / Чувствительность к ультрафиолету; • Процесс, связанный с изучением особенностей человека с участием съемочной техники • <i>Hypersensitivity to light / Light sensitiveness / Light sensitivity / Ultraviolet sensitivity;</i> • <i>A process involving the study of human features involving photography equipment</i>
Диплопия <i>Diplopia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Двустороннее / Чего-то два / Что-то двойное; • Кожное заболевание; • На коже или на слизистой • <i>Something bilateral / Two of something / Something double;</i> • <i>A skin disease;</i> • <i>Something on the skin or mucosa</i>
Ангионевротический отек <i>Angioedema</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Генерализованный отек в дыхательных путях; • Отек верхних дыхательных путей; • Отек горла на фоне стресса / Отек нервных окончаний гортани / Отек, вызванный психосоматикой; • Спазм горла; • Это сильные отеки, их может быть даже не видно, они могут быть внутренние • <i>Generalised swelling in the airways;</i> • <i>Swelling of the upper respiratory tract;</i> • <i>Stress-induced throat oedema / Oedema of laryngeal nerve endings / Psychosomatically induced oedema;</i> • <i>Throat spasm;</i> • <i>These are severe swellings. They may even be invisible; they may be internal</i>
Диспепсия <i>Dyspepsia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Чего-то два; • Нарушение работы фермента пепсина; • Что-то похожее на отслоение клеток; • Сужение сосудов • <i>Two of something;</i> • <i>A pepsin enzyme disorder;</i> • <i>Something that looks like cellular detachment;</i> • <i>Narrowing of vessels</i>
Анурия <i>Anuria</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Недержание мочи; • Отрицательное действие чего-то • <i>Urinary incontinence;</i> • <i>A negative effect of something</i>

Продолжение таблицы 5

Table 5 (continued)

Термин <i>Term</i>	Ответы респондентов <i>Respondents' answers</i>
Мелена <i>Melena</i>	<ul style="list-style-type: none"> Женское имя; Кожное заболевание; Лекарственное растение; Термин из онкологической сферы; Что-то черное <i>A female name;</i> <i>A skin condition;</i> <i>A medicinal plant;</i> <i>An oncology-related term;</i> <i>Something black</i>
Пустулез <i>Pustulosis</i>	<ul style="list-style-type: none"> Заболевание пищеварительной системы; Как туберкулез? Может быть, что-то связанное с легкими; Что-то со стулом <i>A disease of the digestive system;</i> <i>Like tuberculosis?</i> <i>Could be something to do with the lungs;</i> <i>Something wrong with the stool</i>
Ринит <i>Rhinitis</i>	<ul style="list-style-type: none"> Заболевание горла; Что-то связанное с простудой; Что-то опасное <i>Sore throat;</i> <i>Something associated with a common cold;</i> <i>Something dangerous</i>
Тахифилаксия <i>Tachyphylaxis</i>	<ul style="list-style-type: none"> Сердечные сбои / Что-то с сердцем / Как тахикардия / Изменение сердцебиения / Остановка сердца; Замедление чего-то; Импульсивное сокращение; Нарушение чего-то; Связано с легкими / Учащенное дыхание; Что-то с интоксикацией <i>Heart failure / Something wrong with the heart / Like tachycardia / Change in heartbeat / Heart stopping;</i> <i>Slowing something down;</i> <i>Impulsive contraction;</i> <i>A disturbance of something;</i> <i>Something connected with the lungs / Rapid breathing;</i> <i>Something related to intoxication</i>
Парестезия <i>Paresthesia</i>	<ul style="list-style-type: none"> Неконтролируемое движение или обездвиживание; Спазмирование; Что-то с кожей <i>Uncontrolled movement or immobilisation;</i> <i>Spasm;</i> <i>Something associated with the skin</i>
Экзантема <i>Exanthema</i>	<ul style="list-style-type: none"> Как эктоплазма? Что-то внешнее <i>Like ectoplasm?</i> <i>Something external</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Приведено не полное резюме всех неправильных ответов, а наиболее частые варианты (за исключением «не знаю», «не понимаю» и т.п.) и (или) неожиданные.

Note. This table summarises only the most frequent incorrect answers (excluding "I don't know", "I don't understand", etc.) and (or) unexpected ones.

Например, многие респонденты определяли термин «фотосенсибилизация» как повышенную чувствительность к свету, что может интерпретироваться как нарушение со стороны органа зрения, а не со стороны кожных покровов. Также наблюдались случаи, когда тяжесть определяемого состояния была завышена («остановка сердца» при определении термина «тахифилаксия», «что-то опасное» при определении термина «ринит») или когда причины состояния называли

неверно, что может повлечь за собой неверные манипуляции по оказанию доврачебной помощи при выявлении соответствующих нежелательных реакций (например, связь со стрессом или нервными окончаниями в определении термина «ангионевротический отек»). Следовательно, пока для конкретного медицинского термина не подтверждено обратное, его определение должно быть введено в ЛВ для надлежащего информирования пациентов о возможных рисках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На выборке 63 респондентов проведено тестирование понятности 11 случайных медицинских терминов в утвержденных инструкциях по медицинскому применению лекарственных препаратов, зарегистрированных в России. Результаты теста были обработаны статистически для выявления связи между понятностью терминов и демографическими характеристиками (возраст, уровень образования и др.). Установлено, что некоторые демографические характеристики целевой аудитории (наличие высшего образования) влияют на правильность прохождения тестиро-

вания. Для характеристики «постоянный прием лекарственных средств» получены сомнительные результаты, требующие уточнения в выборке с большим количеством участников. Следует обратить внимание на термины, которые вызывают наибольшие трудности в понимании, и дополнительно пояснить их в тексте инструкции или заменить на более понятные синонимы. Пока для конкретного медицинского термина не подтверждено обратное, его определение должно быть указано в листке-вкладыше к лекарственному препарату для надлежащего информирования пациентов о возможных рисках.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tong V, Aslani P, Raynor DK, Shipp D, Parkinson B, Lalor D, et al. Developing and user testing new pharmacy label formats – a study to inform labelling standards. *Health Expect.* 2021;24(4):1125–36. <https://doi.org/10.1111/hex.13203>
2. Ancker JS, Grossman LV, Benda NC. Health literacy 2030: Is it time to redefine the term? *J Gen Intern Med.* 2020;35(8):2427–30. <https://doi.org/10.1007/s11606-019-05472-y>
3. Dickinson D, Raynor DK, Duman M. Patient information leaflets for medicines: Using consumer testing to determine the most effective design. *Patient Educ Couns.* 2001;43(2):147–59. [https://doi.org/10.1016/s0738-3991\(00\)00156-7](https://doi.org/10.1016/s0738-3991(00)00156-7)
4. Sless D. *Designing documents for people to use.* Melbourne: Communication Research Institute; 1996.
5. Fuchs J. Design science with a focus on user-centred evaluation of written information. In: Bahri P, ed. *Communicating about risks and safe use of medicines.* Adis Singapore; 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3013-5_12
6. Okan Y, Petrova D, Smith SG, Lesic V, Bruine de Bruin W. How do women interpret the NHS information leaflet about cervical cancer screening? *Med Decis Making.* 2019;39(7):738–54. <https://doi.org/10.1177/0272989X19873647>
7. Munksgaard SB, Allena M, Tassorelli C, Rossi P, Katsarava Z, Bendtsen L, et al. What do the patients with medication overuse headache expect from treatment and what are the preferred sources of information? *J Headache Pain.* 2011;12(1):91–6. <https://doi.org/10.1007/s10194-011-0298-4>
8. Tong V, Raynor DK, Aslani P. Design and comprehensibility of over-the-counter product labels and leaflets: A narrative review. *Int J Clin Pharm.* 2014;36(5):865–72. <https://doi.org/10.1007/s11096-014-9975-0>
9. Pelizzari N. The challenges for EU user testing policies for patient information leaflets. *Int J Environ Res Public Health.* 2024;21(10):1301. <https://doi.org/10.3390/ijerph21101301>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Е.И. Морковин – разработка концепции исследования, анализ и статистическая обработка полученных данных, написание текста рукописи; Е.Ю. Сорокина, Д.В. Куркин – анализ листов-вкладышей зарегистрированных лекарственных препаратов, оценка ответов респондентов, подготовка текста рукописи; А.А. Селезнева, С.А. Лешкова – подготовка опросников, первичная обработка анкет респондентов; А.Г. Солодовников, А.В. Заборовский – критический пересмотр и утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Evgeny I. Morkovin conceived the study, performed the analysis and statistical processing of the results, and drafted the manuscript. Ekaterina Yu. Sorokina and Denis V. Kurkin analysed package leaflets for authorised medicinal products, evaluated the respondents' answers, and drafted the manuscript. Alisa A. Selezneva and Sofya A. Leshkova prepared the questionnaires and conducted the primary processing of the filled-in questionnaires. Alexander G. Solodovnikov and Andrey V. Zaborovsky critically revised and approved the final version of the manuscript for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Морковин Евгений Игоревич, канд. мед. наук, доцент / **Evgeny I. Morkovin**, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7119-3546>

Сорокина Екатерина Юрьевна / **Ekaterina Yu. Sorokina**
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3557-6224>

Солодовников Александр Геннадьевич, канд. мед. наук, доцент / **Alexander G. Solodovnikov**, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4564-2168>

Куркин Денис Владимирович, д-р фарм. наук, доцент / **Denis V. Kurkin**, Dr. Sci. (Pharm.), Associate Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1116-3425>

Селезнева Алиса Андреевна / **Alisa A. Selezneva**

Лешкова Софья Алексеевна / **Sofya A. Leshkova**

Заборовский Андрей Владимирович, д-р мед. наук, доцент / **Andrey V. Zaborovsky**, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7923-9916>

Поступила 11.11.2024

После доработки 16.01.2025

Принята к публикации 11.02.2025

Online first 05.05.2025









Received 11 November 2024

Revised 16 January 2025

Accepted 11 February 2025

Online first 5 May 2025



И.И. Яичков^{1,2}  
А.Л. Хохлов² 
М.К. Корсаков¹ 
Н.Н. Вольхин^{1,2} 
С.С. Петухов^{1,2} 
В.Е. Зайкова^{1,2} 
О.Э. Лазарянец^{1,2} 

Изучение экскреции 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида на крысах

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского», ул. Республиканская, д. 108/1, г. Ярославль, 150000, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Революционная, д. 5, г. Ярославль, 150000, Российская Федерация

✉ Яичков Илья Игоревич; iyaichkov@yspu.org

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Новый селективный ингибитор карбоангидразы II типа 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (TFISA) способен снижать внутриглазное давление при инстилляции в глаза. Данное соединение находится на стадии доклинического исследования. Процесс экскреции TFISA и его метаболитов ранее не изучен.

ЦЕЛЬ. Определение параметров экскреции 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его основных метаболитов у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Работа выполнена на 6 крысах линии Wistar (3 самца и 3 самки). Введение осуществляли путем инстилляции 1% глазной суспензии TFISA в каждый глаз из расчета 3,7 мг/кг. Пробы фекалий и мочи отбирали до введения препарата и многократно до 360 ч после введения. Отбор экскретов проводили с помощью метаболических клеток. Измерение концентрации TFISA, N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M2), N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M1) и продукта его деградации 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфоновой кислоты (M3) в экскретах проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Биоаналитические методики определения TFISA и его метаболитов в экскретах крыс прошли полную валидацию. Аналитический диапазон определения TFISA, M2 и M3 в моче составил 10–10000 нг/мл, M1 – 1–1000 нг/мл. Аналитический диапазон определения концентрации TFISA в фекалиях составил 10–4000 нг/г, M2 и M3 – 5–2000 нг/г, M1 – 1–1000 нг/г. Установлено, что с мочой выводится 45,7±2,0% TFISA в неизменном виде, 38,7±2,7% в виде M1 и продукта его разложения M3, и 4,0±0,6% в виде M2 от общего количества элиминированных соединений. С калом выводится 8,2±1,0% TFISA в неизменном виде, 3,3±0,2% в виде продукта разложения N-гидроксиметаболита M3. Через 336 ч после введения TFISA дальнейшей элиминации не наблюдали.

ВЫВОД. С помощью разработанных и валидированных биоаналитических методик изучена экскреция TFISA и его метаболитов после аппликации глазной суспензии крысам в одной дозе. TFISA выводится преимущественно ренальным путем в неизменном виде, а также в виде N-гидроксиметаболита, который в процессе отбора образцов практически полностью разлагается до производного сульфокислоты. N-ацетилметаболит является минорным и выводится только с мочой.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС; моча; фекалии; валидация; крысы; глаукома; экскреция; фармакокинетика; ингибитор карбоангидразы II; N-гидроксисульфонамид; метаболит

Для цитирования: Яичков И.И., Хохлов А.Л., Корсаков М.К., Вольхин Н.Н., Петухов С.С., Зайкова В.Е., Лазарянц О.Э. Изучение экскреции 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида на крысах. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(5):508–520. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-697>

Финансирование. Статья подготовлена в рамках Государственного задания Ярославского государственного педагогического университета им. К.Д. Ушинского на 2024 год от Минпросвещения РФ по теме «Разработка нового лекарственного средства для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе ингибитора моноаминоксидазы» (номер реестровой записи 720000Ф.99.1.БН62АА12000).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ilya I. Yaichkov^{1,2}  
Alexander L. Khokhlov² 
Mikhail K. Korsakov¹ 
Nikita N. Volkhin^{1,2} 
Sergey S. Petukhov^{1,2} 
Valeria E. Zaykova^{1,2} 
Olga E. Lazariants^{1,2} 

Excretion Study of 5-[5-(Trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide in Rats

¹ Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky, 108/1 Respublikanskaya St., Yaroslavl 150000, Russian Federation

² Yaroslavl State Medical University, 5 Revolutsionnaya St., Yaroslavl 150000, Russian Federation

✉ Ilya I. Yaichkov; iyaichkov@yspu.org

ABSTRACT

INTRODUCTION. The administration of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (TFISA) into the eyes can reduce intraocular pressure. Currently, this novel selective carbonic anhydrase II inhibitor is at the preclinical research stage. The excretion of TFISA and its metabolites has not been studied yet.

AIM. This study aimed to calculate the parameters of urinary and faecal excretion of TFISA and its major metabolites in rats.

MATERIALS AND METHODS. The study was performed in 6 Wistar rats (3 males and 3 females). The rats received an instillation of 1% TFISA ophthalmic suspension in each eye at a dose of 3.7 mg/kg. Stool samples were taken prior to TFISA administration and at multiple intervals up to 360 h afterwards. Excreta were collected using metabolic cages. The study used high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) to measure the concentrations of TFISA, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (M2), and N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (M1) with its degradation product 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonic acid (M3) in the excreta.

RESULTS. The study involved full validation of bioanalytical procedures for the determination of TFISA and its metabolites in rat excreta. The analytical ranges were 10–10,000 ng/mL for the urinary levels of TFISA, M2, and M3; 1–1,000 ng/mL for the urinary levels of M1; 10–4,000 ng/g for the faecal levels of TFISA; 5–2,000 ng/g for the faecal levels of M2 and M3; and 1–1,000 ng/g for the faecal levels of M1. Out of the total amount eliminated, 45.7±2.0% of unchanged TFISA, 38.7±2.7% of TFISA in the form of M1 and its degradation product M3, and 4.0±0.6% of TFISA in the form of M2 were excreted in urine, while 8.2±1.0% of unchanged TFISA and 3.3±0.2% of the N-hydroxy metabolite M3 were excreted in faeces. TFISA elimination continued for up to 336 h after administration.

CONCLUSION. The developed and successfully validated bioanalytical procedures were used to study the excretion of TFISA and its metabolites in rats after single-dose administration of the ophthalmic TFISA suspension. According to the results, TFISA is predominantly excreted unchanged in urine. In addition, TFISA is eliminated as its N-hydroxy metabolite, which almost completely degrades to the sulfonic acid derivative during the sampling process. The N-acetyl metabolite of TFISA is minor and is exclusively excreted in urine.

Keywords: HPLC–MS/MS; urine; faeces; validation; rats; glaucoma; excretion; pharmacokinetics; selective carbonic anhydrase II inhibitor; N-hydroxysulfonamide; metabolite

For citation: Yaichkov I.I., Khokhlov A.L., Korsakov M.K., Volkhin N.N., Petukhov S.S., Zaykova V.E., Lazariants O.E. Excretion study of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide in rats. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(5):508–520. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-697>

Funding. The article was prepared as part of the 2024 State Assignment 'Development of a novel medicine for the treatment of neurodegenerative diseases on the basis of a monoamine oxidase inhibitor' from the Ministry of Education of the Russian Federation to the Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky (R&D Registry No. 720000Ф.99.1.5Н62АА12000).

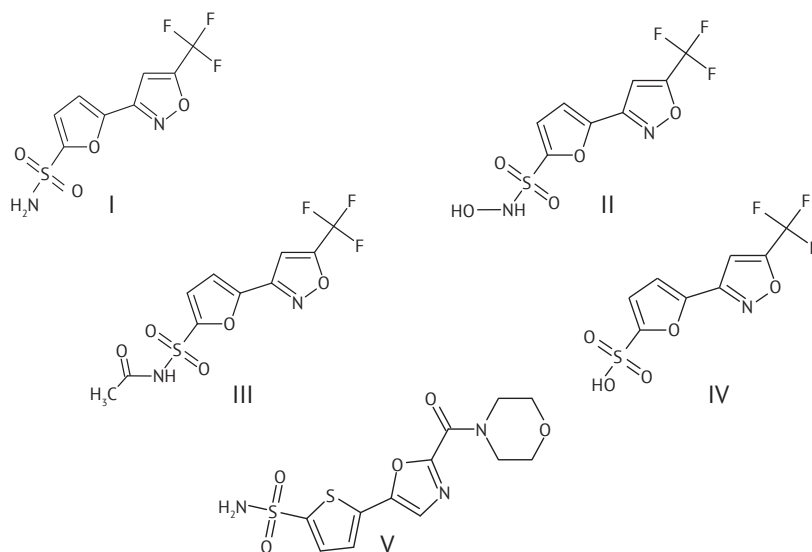
Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Селективные ингибиторы карбоангидразы II типа (ИКАII) широко используются для лечения открытоугольной глаукомы. Данные препараты уменьшают образование внутриглазной жидкости, снижая тем самым внутриглазное давление [1]. 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (TFISA) (I) является новым представителем ИКАII местного действия [2]. В настоящий момент субстанция TFISA и его глазная суспензия проходят доклиническое изучение эффективности, безопасности и фармакокинетики. Данное соединение, а также его основные метаболиты N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (M1) (II) и N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (M2) (III) способны накапливаться в эритроцитах, что приводит к их длительному выведению (период полувыведения более 2 сут) [3–5]. Об этом свидетельствуют высокие по сравнению с плазмой концентрации этих аналитов в цельной крови.

Процесс экскреции TFISA и его метаболитов ранее не изучался. Для данного исследования необходима более длительная продолжительность эксперимента, чем при изучении системной экспозиции и относительной биодоступности, так как в крайней точке (216 ч после введения препарата) концентрации TFISA и M1 в крови были выше предела количественного определения методики [4]. Продление эксперимента до 2 недель предположительно позволит наблюдать полную элиминацию TFISA из организма крыс.

Биоаналитические методики, используемые для количественного определения лекарственных веществ и их метаболитов в экскретах, должны быть валидированы в том же объеме, что и методики определения веществ в плазме или цельной крови¹. Такой подход применен при фармакокинетических исследованиях агаротриозы [6], иринотекана [7], DL0410 [8], а также при терапевтическом лекарственном



¹ Guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. ICH; 2022.

Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

мониторинге трамадола и прегабалина [9]. Калибровочные образцы и образцы контроля качества фекалий, как и тканей, в рамках валидации, как правило, готовят путем добавления рабочих растворов стандартного образца определяемого соединения к гомогенату холостого образца (интактного биоматериала) [10–12]. Данный способ является наиболее удобным при исследованиях распределения и экскреции. Модельные смеси мочи, как и других видов биологических жидкостей (цельной крови, плазмы и др.), получают путем смешивания раствора стандартного образца определяемого соединения с холостой пробой (интактным биоматериалом) [9–10].

Метаболит М1 в биологических жидкостях нестабилен и быстро разрушается с образованием 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфоновой кислоты (М3) (IV) [3–5]. Так, в пробах мочи без добавления стабилизатора в течение 1 ч разлагается более 50% от начального количества М1, а через 8 ч данное соединение полностью превращается в М3. Несмотря на то что в крови и плазме М3 не обнаружен [3], целесообразно его определение в экскретах (в дополнение к TFISA, М1 и М2, которые являлись целевыми аналитами при оценке плазмы и цельной крови), поскольку можно предполагать деградацию М1 во время нахождения мочи в мочевыводящих путях и кала в кишечнике крыс, а также в процессе отбора биоматериала. Поскольку экскреты обычно отбирают не в конкретные временные точки, а в интервалы продолжительностью примерно 2–24 ч [7, 8], предотвратить такое разложение затруднительно. Пробы мочи крыс при этом необходимо стабилизировать с целью получения воспроизводимых и корректных результатов измерения концентрации М1 и М3 в рамках валидации и анализа испытываемых образцов².

Цель работы – определение параметров экскреции 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его основных метаболитов у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Действующее вещество 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид, лабораторная серия его глазной суспензии (1%) и образцы метаболитов произведены в ЦТФТ им. М.В. Дорогова ЯГПУ им. К.Д. Ушинского [4]. Соединения, применяемые в качестве стандартных образцов, были

проанализированы и охарактеризованы с помощью методов спектроскопии ядерного магнитного резонанса, спектроскопии в инфракрасной области спектра, масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии. Массовая доля TFISA в используемой серии субстанции составила 99,1%, в соответствующих образцах метаболитов массовая доля составила: 98,2% для М1, 98,5% для М2, массовая доля М3 составила 98,7%, 98,3% для 5-[2-(морфолин-4-карбонил)-1,3-оксазол-5-ил]-тиофен-2-сульфонамида (THSA; внутренний стандарт, (V)). Основные растворы и рабочие растворы анализируемых веществ и внутреннего стандарта THSA готовили в диметилсульфоксиде (х.ч., АО «Ленреактив») (режим хранения – не выше 4 °С).

Определение концентрации TFISA и его метаболитов осуществляли с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies), совмещенного с tandemным масс-спектрометрическим детектором AB Sciex QTRAP5500 (AB Sciex) (программное обеспечение «Analyst 1.6.2» – управление ВЭЖХ-МС/МС системой; «MultiQuant 3.0.5» – интегрирование хроматограмм).

Для хроматографического разделения применяли колонку Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (150×3,0 мм, 3,5 мкм) с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (12,5×2,1 мм, 5,0 мкм). Элюирование проводили в градиентном режиме при скорости потока 550 мкл/мин и температуре термостата 40 °С. Динамика изменения соотношения компонентов подвижной фазы: 0,1% водного раствора муравьиной кислоты (≥99%, Acros Organics) (А) и метанола (LiChrosolv hypergrade for LC-MS, Merck KGaA) (В) представлена в *таблице 1*.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме ионизации электрораспылением, полярность отрицательная, напряжение – 4500 В; температура источника ионов – 700 °С. Использовали режим мониторинга множественных реакций (MRM) (*табл. 2*). Для расчетов концентрации М1 применяли MRM-переход THSA 342→110 m/z, для других аналитов – MRM-переход THSA 342→78 m/z.

Исследуемые образцы. Образцы мочи крыс стабилизировали 5% раствором аскорбиновой кислоты из расчета 20 мкл раствора стабилизатора на 100 мкл мочи. Дальнейшую пробоподготовку осуществляли путем разведения раствором внутреннего стандарта: к 25 мкл образца добавляли 200 мкл раствора THSA 0,5 мг/мл в метаноле,

² Там же.

Таблица 1. Параметры градиентного элюирования

Table 1. Gradient elution conditions

Время, мин <i>Time, min</i>	Подвижная фаза А, 10 мМ водный р-р формиата аммония, % <i>Mobile phase A, 10mM ammonium formate in water, %</i>	Подвижная фаза В, метанол, % <i>Mobile phase B, methanol, %</i>
0,0	65	35
0,5	65	35
2,0	35	65
6,0	35	65
6,1	10	90
8,0	10	90
8,1	65	35
10,0	65	35

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Таблица 2. Параметры масс-спектрометрического детектирования в режиме мониторинга множественных реакций

Table 2. Parameters of mass spectrometric detection in the multiple reaction monitoring mode

MRM-переходы, m/z <i>MRM transitions, m/z</i>									
TFISA		M1		M2		M3		THSA	
количе- ственный <i>quantitat- ive</i>	контроль- ный <i>control</i>	количе- ственный <i>quantitat- ive</i>	контроль- ный <i>control</i>	количе- ственный <i>quantitat- ive</i>	контроль- ный <i>control</i>	количе- ственный <i>quantitat- ive</i>	контроль- ный <i>control</i>	ВС для TFISA <i>IS for TFISA</i>	ВС для M1, M2 <i>IS for M1 and M2</i>
281→136	281→66	297→136	297→66	323→136	323→66	282→136	282→66	342→78	342→110

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. MRM – мониторинг множественных реакций, TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M3 – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфоновая кислота; THSA – 5-[2-(морфолин-4-карбонил)-1,3-оксазол-5-ил]-тиофен-2-сульфонамид; ВС – внутренний стандарт.

Note. MRM, multiple reaction monitoring; TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M3, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonic acid; THSA, 5-[2-(morpholine-4-carbonyl)-1,3-oxazole-5-yl]-thiophene-2-sulfonamide; IS, internal standard.

затем смесь перемешивали и центрифугировали (Heraeus Multifuge X3R, Thermo Fisher Scientific) 5 мин при скорости 10000 об./мин.

Фекалии взвешивали (с точностью до 0,1 мг), к ним добавляли метанол в соотношении 1:3 (масса, г : объем, мл) и проводили их гомогенизацию с использованием шарикового гомогенизатора Homogenizer Bioprep-6 (Allsheng). Затем гомогенат центрифугировали 5 мин при 3000 об./мин и к 50 мкл надосадочной жидкости добавляли 300 мкл метанольного раствора THSA. Смесь перемешивали на шейкере и центрифугировали 5 мин при 10000 об./мин.

Приготовление калибровочных и образцов контроля качества. Приготовление калибровочных (K1–K8) образцов, образцов контроля качества (нижнего предела количественного определения (НПКО), нижнего, среднего и верхнего

уровней концентрации), образцов для теста разведения (Dil) выполняли путем добавления к биологическим объектам комбинированных рабочих растворов TFISA, M1, M2, M3 в диметилсульфоксиде, концентрация которых в 20 раз превосходила концентрацию аналитов в соответствующем образце мочи или кала (табл. 3). Для этого смешивали 190 мкл мочи или гомогената фекалий и 10 мкл рабочего раствора. В пробирку к пробам мочи предварительно вносили 40 мкл 5% раствора аскорбиновой кислоты. Холостые образцы экскретов для приготовления модельных смесей отбирали у 6 крыс линии Wistar (питомник ООО «СМК Стезар», г. Владимир) массой 230–270 г с помощью метаболических клеток.

Валидацию биоаналитических методик проводили в полном объеме согласно требованиям Правил проведения исследований

биоэквивалентности лекарственных препаратов³ к хроматографическим методикам анализа. Дополнительно изучали воспроизводимость при повторном введении аналитической серии согласно руководству ICH M10⁴.

Лабораторные животные. Для фармакокинетической части исследования использованы крысы линии Wistar (питомник ООО «СМК Стезар», г. Владимир). Эксперимент проведен на 6 особях (3 самца и 3 самки) массой 250±6 г ($M \pm SME$) и возрастом 15 недель. Инстилляцию 1% глазной суспензии TFISA осуществляли в каждый глаз в одинаковом объеме. Доза составляла 3,7 мг/кг, как и в исследованиях фармакокине-

тики в крови и плазме [4, 5]. За 4 ч до введения TFISA и 2 ч после введения TFISA доступ к комбикорму (АО «Гатчинский ККЗ») и воде был ограничен. В дальнейшем режим питания и питья был свободным. Цикл освещения: 12 ч – день, 12 ч – ночь. Для отбора проб экскретов и содержания животных применяли метаболические клетки.

Сбор образцов мочи и кала. Образцы собирали в следующие промежутки времени:

- моча (ч): до введения препарата (–4–0), после введения препарата: 0–4, 4–8, 8–12, 12–24, 24–48, 48–72, 72–96, 96–120, 120–144, 144–168, 168–192, 192–216, 216–240, 240–264, 264–288, 288–312, 312–336, 336–360;

Таблица 3. Концентрации 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в модельных образцах мочи и фекалий крыс

Table 3. Concentrations of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in spiked samples of rat urine and faeces

Модельные образцы <i>Spiked samples</i>	Концентрация аналитов <i>Concentration</i>				
	Моча, нг/мл <i>Urine, ng/mL</i>		Фекалии, нг/г <i>Faeces, ng/g</i>		
	TFISA, M2, M3	M1	TFISA	M1	M2 и M3
К1 (НПКО) <i>(LLOQ)</i>	10	1	10	1	5
К2	50	5	50	5	25
К3	250	25	250	25	125
К4	1000	100	500	50	250
К5	2500	250	1000	100	500
К6	5000	500	2000	200	1000
К7	7500	750	3000	300	1500
К8	10000	1000	4000	400	2000
Нижний уровень концентрации <i>LQC</i>	30	3	30	1	15
Средний уровень концентрации <i>MQC</i>	3750	375	1500	150	750
Верхний уровень концентрации <i>HQC</i>	8750	875	3500	350	1750
Dil	15000	1500	7000	700	3500

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; НПКО – нижний предел количественного определения; Dil – образцы для теста разведения.

Note. TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; LLOQ, lower limit of quantification; LQC, low concentration quality control sample; MQC, middle concentration quality control sample; HQC, high concentration quality control sample; Dil, samples for the dilution integrity test.

³ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

⁴ Guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. ICH; 2022.

- кал (ч): до введения препарата (-4-0), после введения 0-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144, 144-168, 168-192, 192-216, 216-240, 240-264, 264-288, 288-312, 312-336, 336-360.

После окончания периода отбора объем мочи измеряли с помощью мерного цилиндра на 25 мл (класс точности 1) и аликвоту 200 мкл стабилизировали смешением с 40 мкл 5% раствора аскорбиновой кислоты. Фекалии взвешивали и гомогенизировали в метаноле в объемном соотношении 1:3. Затем пробы стабилизированной мочи и гомогенатов кала замораживали и хранили при температуре не выше -70 °C до проведения анализов (морозильная камера MELING DV-HL218).

Исследование одобрено этическим комитетом ЯГПУ им. К.Д. Ушинского (протокол № 2 от 10.10.2023).

Для расчета **показателей описательной статистики**, таких как среднее арифметическое (M), относительное стандартное отклонение (RSD), стандартная ошибка среднего (SEM), применен программный пакет «Statsoft Statistica 10.0.1011». Для построения графиков использовали Microsoft Excel 2016.

Расчеты. Количество аналитов в пробе мочи или кала рассчитывали в нг (1):

$$m(A) = C(A) \times V, \quad (1)$$

где $m(A)$ – количество аналита, экскретированного с мочой или калом в данный период отбора; $C(A)$ – концентрация аналита в пробе мочи (нг/мл) или кала (нг/г); V – объем мочи (мл) или масса кала (г), экскретированные в данный период отбора.

Количество $M3$ во время всех фармакокинетических вычислений пересчитывали на массу $M1$ по формуле (2). Массы неизмененного $M1$ и $M1$ в виде $M3$ затем суммировали.

$$m(M1) = \frac{m(M3) \times M(M1)}{M(M3)}, \quad (2)$$

где $m(M1)$ – количество $M1$ в пересчете с массы $M3$; $m(M3)$ – количество $M3$, определенное в экскрете; $M(M1)$ – молекулярная масса $M1$; $M(M3)$ – молекулярная масса $M3$.

При построении графика кумулятивной экскреции (Me) и расчете доли экскретировавшихся аналитов в общем количестве элиминированных соединений массу $M1$ и $M2$ аналогичным

образом пересчитывали на массу TFISA на основании отношения молекулярных масс.

Долю TFISA, $M1$ и $M2$ в общем количестве элиминированных соединений рассчитывали по формуле (3):

$$\%(A) = \frac{m(A_{TFISA})}{(m(TFISA)_{ur} + m(M1)_{ur} + m(M2)_{ur}) + (m(TFISA)_{fe} + m(M1)_{fe} + m(M2)_{fe})} \times 100\%, \quad (3)$$

где $\%(A)$ – доля TFISA, $M1$ или $M2$, экскретированных с мочой, или с калом, или суммарно с мочой и калом; $m(A_{TFISA})$ – количество TFISA, $M1$ или $M2$ в пересчете на TFISA, экскретированных с мочой, или с калом, или суммарно с мочой и калом за 360 ч после инстилляционной суспензии; $m(TFISA)_{ur/fe}$ – суммарное количество TFISA, экскретированного с мочой (ur) или калом (fe) за 360 ч после инстилляционной суспензии; $m(Mn)_{ur(fe)}$ – суммарное количество $M1$ или $M2$, экскретированных с мочой (ur) или калом (fe), в пересчете на массу TFISA, за 360 ч после инстилляционной суспензии.

Вычисление скорости экскреции проведено без пересчета массы $M1$ и $M2$ на массу TFISA по формуле (4):

$$V_E = \frac{m(A)}{T}, \quad (4)$$

где V_E – скорость экскреции, нг/ч; $m(A)$ – количество аналита, обнаруженного в экскрете за период отбора, нг; T – продолжительность периода отбора, ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методика хроматографического разделения, использованная при фармакокинетическом исследовании в крови и плазме [4, 5], была изменена с целью достижения достаточного разрешения между хроматографическими пиками TFISA и продукта разложения N -гидроксиметаболита $M3$ (рис. 1). Так, эмпирическим путем вместо 0,1% водного раствора муравьиной кислоты был выбран 10 мМ водный раствор формиата аммония. Для предотвращения окисления остатков $M1$ в пробах мочи был применен 5% водный раствор аскорбиновой кислоты. Дополнительной стабилизации метанольных гомогенатов фекалий не требовалось.

При оценке селективности методики установлено, что площадь пиков TFISA в холостых образцах мочи крыс составила 10,55% от площади пика TFISA в образцах НПКО, а в образцах фекалий

крыс – 12,24%. Интерференция в области времени удерживания других аналитов и THSA отсутствовала. При испытаниях внутрисерийной и межсерийной правильности и прецизионности, эффекта разведения образцов величина относительной погрешности (δ) рассчитанных концентраций изучаемых соединений не превышала $\pm 15\%$ (20% – для образцов с концентрацией

на уровне НПКО), а величина их относительного стандартного отклонения (RSD , %) не превышала 15% (20% – для образцов с концентрацией на уровне НПКО) для обеих методик (табл. 4, 5. «Результаты валидации методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в моче и кале крыс». Опубликовано на сайте журнала⁵). Это

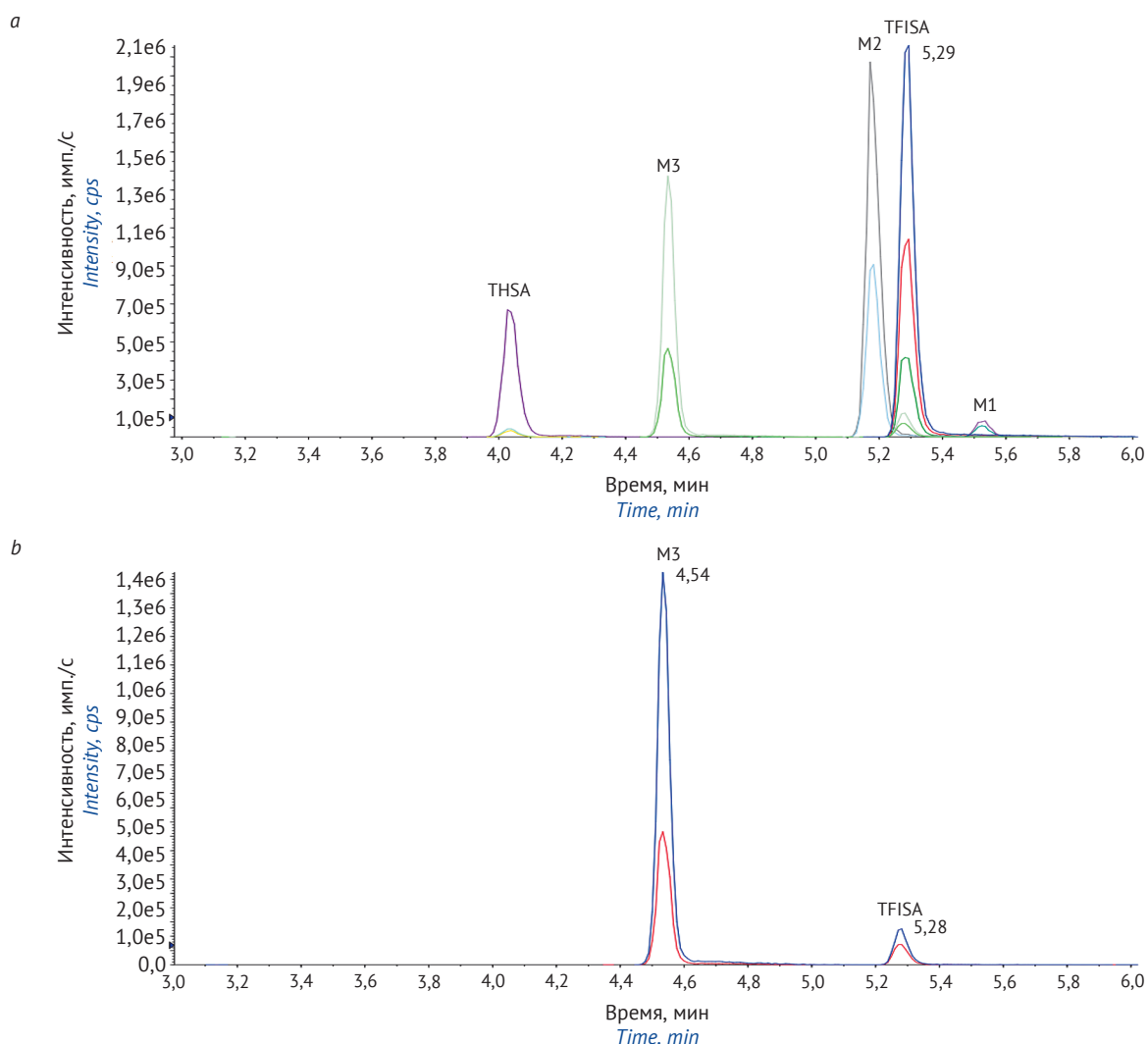


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Пример хроматограммы калибровочного образца К6 мочи крысы: а – хроматограммы всех MRM-переходов; б – хроматограммы MRM-переходов M3 (282→136 m/z; 282→66 m/z), на которых присутствует хроматографический пик TFISA. TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M3 – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфоновая кислота; THSA – 5-[2-(морфолин-4-карбонил)-1,3-оксазол-5-ил]-тиофен-2-сульфонамид

Fig. 1. A chromatogram of the K6 calibration sample of rat urine (chromatograms of all the MRM transitions, a, and those of M3 (282→136 m/z; 282→66 m/z), b, that have a chromatographic peak TFISA. TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M3 – 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonic acid; THSA, 5-[2-(morpholine-4-carbonyl)-1,3-oxazole-5-yl]-thiophene-2-sulfonamide

⁵ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-697-table4>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-697-table5>

соответствует установленным требованиям⁶. Значение *RSD* нормализованного фактора матрицы (NMF) TFISA и его метаболитов после испытаний образцов мочи и кала, полученных от 6 разных животных, составило менее 15%.

Добавление 5% раствора аскорбиновой кислоты к образцам мочи и гомогенизация фекалий с метанолом позволили предотвратить разложение М1 после отбора проб, а также обеспечить сохранность действующего вещества и других метаболитов. Так, результаты испытания краткосрочной, долгосрочной стабильности, стабильности после заморозки/разморозки, стабильности приготовленных образцов в автодозаторе соответствовали критериям приемлемости для обоих изучаемых биологических матриц (табл. 6. «Результаты изучения стабильности 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фурани-2-сульфонамида и его метаболитов в моче и гомогенатах фекалий крыс». Опубликована на сайте журнала⁷). Отклонение рассчитанной концентрации аналитов от номинальной не превышало 15%. Правильность и прецизионность при повторном введении аналитических серий с образцами мочи и фекалий спустя 48 ч сохранялись на требуемом уровне (табл. 4, 5⁹)¹⁰.

После успешной валидации биоаналитических методик они были применены для анализа образцов экскретов крыс. Установлено, что 53,91±2,32% изучаемого соединения ($M \pm SEM$, от общего количества элиминированных соединений) выводится в неизменном виде: из них 45,74±2,06% — с мочой и 8,17±0,97% — с калом (табл. 7). Кумулятивная экскреция TFISA достигается спустя 336 ч после инстилляции суспензии (рис. 2). Наивысшую скорость ренальной экскреции действующего вещества наблюдали в первые 12 ч после введения (рис. 3a). С калом TFISA наиболее интенсивно выводится в период 48–72 ч (рис. 3b).

В форме М1 выводится 42,07±2,70% действующего вещества ($M \pm SEM$, от общего количества элиминированных соединений). При этом большая часть N-гидроксиметаболита определялась

косвенно по продукту разложения до М3. Так, М1 обнаружен только в образцах мочи, отобранных на начальном этапе после введения (в промежутки 0–4, 4–8, 8–12, 12–24 ч). За более длительные временные отрезки данное соединение полностью переходило в форму М3. Дифференциацию М3, образовавшегося в экскретах в процессе отбора проб, от М3, образовавшегося при формировании каловых масс и нахождения в мочевыводящих путях, не проводили, так как данный процесс не является физиологическим и не характеризует особенности метаболизма TFISA. М3 в организме крыс не обнаружен [13]. Содержание М1 и М3 в моче и кале ситуационно зависит от времени нахождения в кишечнике или мочевом пузыре. Так, при большем объеме питья или количестве съеденной пищи выведение М1 пройдет быстрее, и он деградирует в меньшем количестве, и наоборот. Поэтому даже при немедленной после испражнения стабилизации соотношение М1/М3 в изучаемых объектах будет нестабильным и не воспроизведется при повторном эксперименте даже у того же животного.

Установлено, что N-гидроксиметаболит выводится в основном через почки — 38,73±2,72% ($M \pm SEM$) от общего количества TFISA. M_e данного метаболита наступает спустя 336 ч эксперимента, как и для исходного изучаемого соединения. Наибольшая скорость ренальной экскреции М1 достигается в промежутке 8–12 ч после инстилляции глазной суспензии (рис. 3a), что соответствует периоду снижения его концентрации на фармакокинетических профилях в плазме и крови [3, 4]. Динамика выведения М1 с калом (рис. 3b) была наиболее интенсивной в период 24–120 ч после начала эксперимента.

N-ацетилметаболит элиминирован только с мочой. Его доля составляет 4,02±0,58% от суммарного количества экскретированных соединений. Максимальную V_e наблюдали в первые 4 ч после введения препарата (рис. 3). Большая часть М2 выводится за первые 96 ч эксперимента,

⁶ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

Guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. ICH; 2022.

⁷ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-697-table6>

⁸ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

Guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. ICH; 2022.

⁹ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-697-table4>

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-697-table5>

¹⁰ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

Guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. ICH; 2022.

Таблица 7. Результаты изучения экскреции 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов с мочой и калом

Table 7. Excretion study results for 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in urine and faeces

Способ экскреции <i>Route of excretion</i>	Аналит, в виде которого выводится лекарственное средство <i>Excreted analytes</i>	Доля от суммы экскретированных соединений <i>Percentage of the total compounds excreted</i>	
		<i>M±SME, %</i>	<i>RSD, %</i>
Моча <i>Urine</i>	TFISA	45,74±2,06	11,02
	M1*	38,73±2,72	17,20
	M2	4,02±0,58	35,22
	Суммарно (<i>total</i>)	88,49±1,15	3,17
Кал <i>Faeces</i>	TFISA	8,17±0,97	29,06
	M1*	3,34±0,24	17,72
	Суммарно (<i>total</i>)	11,51±1,15	24,37
Моча и кал (суммарно) <i>Urine and faeces (total)</i>	TFISA	53,91±2,32	10,56
	M1*	42,07±2,70	15,71
	M2	4,02±0,58	35,22

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид.

* Расчет содержания M1 в экскретах проводился косвенно, по концентрации M3. M – среднее арифметическое, RSD – относительное стандартное отклонение, SEM – стандартная ошибка среднего.

Note. TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide.

* The calculation of the M1 content in rat excreta was carried out indirectly, using the concentration of M3. M, arithmetic mean; RSD, relative standard deviation; SEM, standard error of the mean.

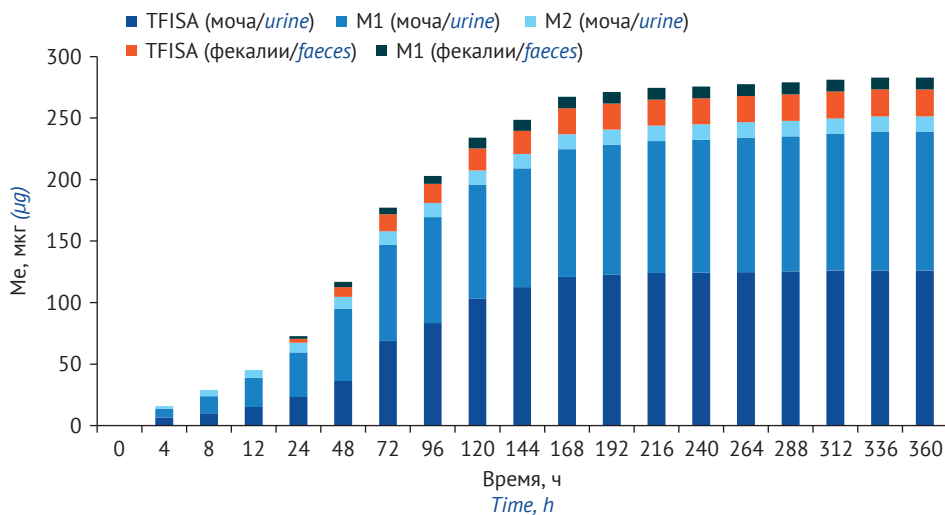


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Кумулятивная экскреция 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида в неизменном виде и в виде метаболитов

TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M3 – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфоновая кислота; M_e – кумулятивная экскреция

Fig. 2. Cumulative excretion of unchanged 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M3, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonic acid; M_e , cumulative excretion

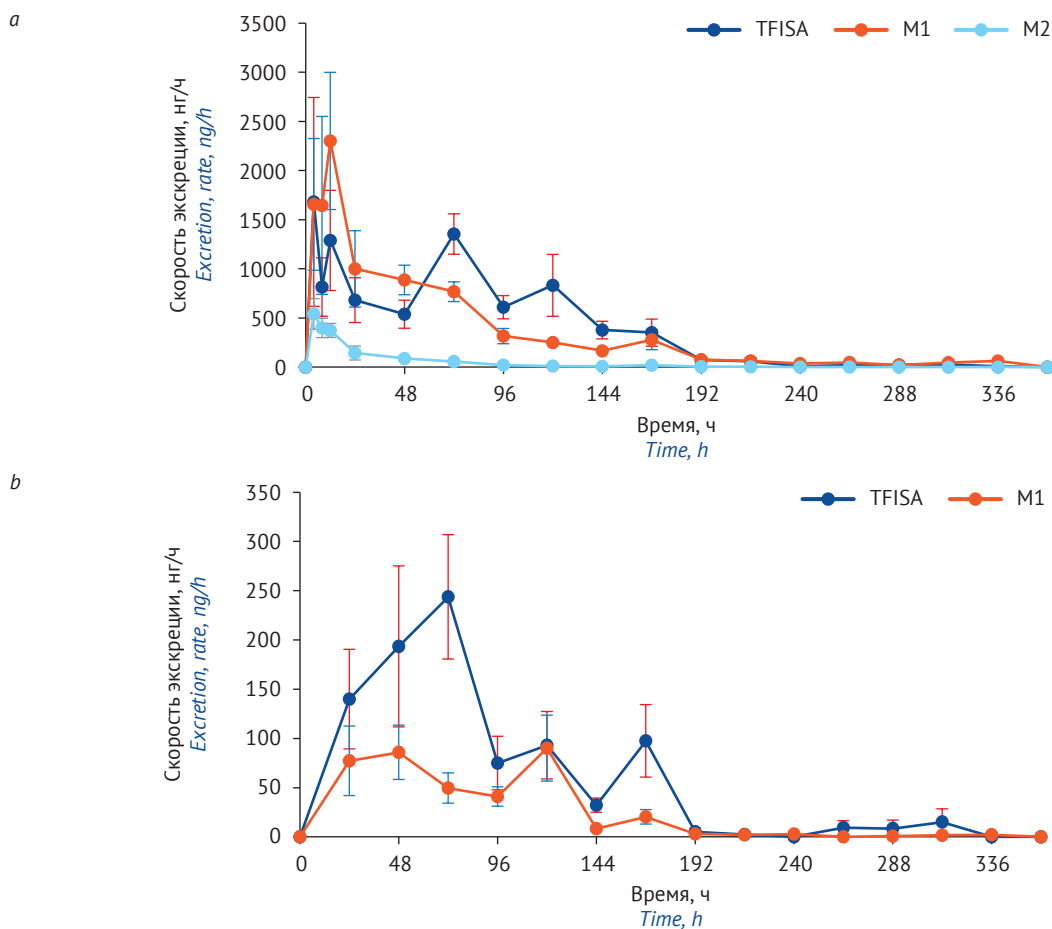


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Скорость экскреции 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов с мочой (а) и калом (б). TFISA – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M1 – N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M2 – N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид; M3 – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфоновая кислота

Fig. 3. Excretion rates of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in urine (a) and faeces (b). TFISA, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M1, N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M2, N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide; M3, 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonic acid

а спустя 312 ч концентрация M2 в пробах мочи ниже предела количественного определения методики.

Суммарная величина кумулятивной экскреции изучаемого соединения и его метаболитов с мочой и калом составила $278,0 \pm 40,8$ мкг, что является $29,77 \pm 3,62\%$ от введенной дозы ($M \pm SEM$) (рис. 2). Это может свидетельствовать о наличии либо других путей экскреции, либо низкой абсолютной биодоступности TFISA при инстилляции в глаза. Наличие дополнительного метаболита или метаболитов, на долю которых приходилось бы около 70% от M_e препарата, маловероятно ввиду высокой чувствительности скринингового ВЭЖХ-МС/МС-метода, примененного при исследовании биотрансформации [13]. Кроме того, в данной работе были учтены все возможные

модификации молекулы TFISA. Поэтому целесообразно проведение дополнительного эксперимента с внутрибрюшинным введением суспензии крысам, при котором вся доза препарата гарантированно попадает в организм. В этом случае низкая доля выведенных соединений по отношению к введенной дозе будет свидетельствовать о наличии дополнительных путей экскреции, и потребуются более трудоемкое исследование по их изучению на крупных животных.

Таким образом, TFISA в неизменном виде и в виде метаболитов элиминируется преимущественно ренальным путем. Около 11% действующего вещества и M1 экскретируются с калом. Выведение изучаемого соединения из организма крыс с мочой и фекалиями заканчивается через 336 ч после инстилляции глазной

суспензии. Такое длительное время элиминации связано с депонированием TFISA и его основных метаболитов в эритроцитах [3–5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биоаналитические методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида, его метаболитов, а также продукта разложения его N-гидроксипроизводного в моче и кале крыс прошли полную валидацию и были успешно использованы для фармакокинетического исследования. Установлено, что более 53% изучаемого соединения выводится в неизменном виде, более 42% в виде N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и более 4% в виде М2. Следует отметить, что содержание N-гидроксиметабо-

лита в пробах определялось в основном косвенно по продукту его разложения – 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфоновой кислоте. Экскреция 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида, а также N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида происходит преимущественно ренальным путем: на его долю приходится около 89% от суммарного количества элиминированных веществ. В кале обнаружены только действующее вещество и N-гидроксиметаболит. Выведение изучаемого соединения и его метаболитов с мочой и фекалиями из организма крыс заканчивается через 336 ч после введения препарата.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Popovic MM, Schlenker MB, Thiruchelvam D, Redelmeier DA. Serious adverse events of oral and topical carbonic anhydrase inhibitors. *JAMA Ophthalmol.* 2022;140(3):235–42. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2021.5977>
2. Хохлов АЛ, Шетнев АА, Корсаков МК, Федоров ВН, Тюшина АН, Вольхин НН, Вдовиченко ВП. Фармакологические свойства производных сульфонамидов – новых ингибиторов карбоангидразы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2023;175(2):166–70. Khokhlov AL, Shetnev AA, Korsakov MK, Fedorov VN, Tyushina AN, Volkhin NN, Vdovichenko VP. Pharmacological properties of sulfonamide derivatives – new inhibitors of carbonic anhydrase. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2023;175(2):166–70 (In Russ.). <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-175-2-166-170>
3. Khokhlov AL, Yaichkov II, Korsakov MK, Shetnev AA, Volkhin NN, Petukhov SS. Development of quantification methods of a new selective carbonic anhydrase II inhibitor in plasma and blood and study of the pharmacokinetics of its ophthalmic suspension in rats. *Res Results Pharmacol.* 2023;9(4):53–64. <https://doi.org/10.18413/rpharmacology.9.10056>
4. Яичков ИИ, Хохлов АЛ, Корсаков МК, Шетнев АА, Вольхин НН, Петухов СС. Изучение фармакокинетики нового производного изоксазола на крысах с применением ВЭЖХ-МС/МС для анализа проб крови. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2024;14(3):304–16. Yaichkov II, Khokhlov AL, Korsakov MK, Shetnev AA, Volkhin NN, Petukhov SS. Pharmacokinetics study of a new isoxazole derivative in rats using HPLC-MS/MS for blood sample analysis. *Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2024;14(3):304–16 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-304-316>
5. Яичков ИИ, Корсаков МК, Шетнев АА, Вольхин НН, Петухов СС. Разработка и валидация методики количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме лабораторных животных. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2024;13(3):219–30. Yaichkov II, Korsakov MK, Shetnev AA, Volkhin NN, Petukhov SS. Development and validation of the method of quantification of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in laboratory animal plasma. *Drug Development & Registration.* 2024;13(3):219–30 (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1771>
6. Yue J, Cheng W, Wei S, Liu G, Zhou M, Lv Z, Yu M. Development and validation of UHPLC-MS/MS method for quantifying of agarotriose: An application for pharmacokinetic, tissue distribution, and excretion studies in rats. *J Ocean Univ China.* 2023;22:1683–91. <https://doi.org/10.1007/s11802-023-5534-4>
7. Basu S, Zeng M, Yin T, Gao S, Hu M. Development and validation of an UPLC-MS/MS method for the quantification of irinotecan, SN 38 and SN-38 glucuronide in plasma, urine, feces, liver and kidney: Application to a pharmacokinetic study of irinotecan in rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016;1015–1016:34–41. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.02.012>
8. Pang X, Zhao Y, Song J, Kang D, Wu S, Wang L, et al. Pharmacokinetics, excretion and metabolites analysis of DL0410, a dual-acting cholinesterase inhibitor and histamine-3 receptor antagonist. *Mol Med Rep.* 2019;20(2):1103–12. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10306>
9. Almalki AH, Ali NA, Elroby FA, El Ghobashy MR, Emam AA, Naguib IA. ESI–LC–MS/MS for therapeutic drug monitoring of binary mixture of pregabalin and tramadol: Human plasma and urine applications. *Separations.* 2021;8(2):21. <https://doi.org/10.3390/separations8020021>
10. Lu T, Wang X, Zhang Q, Liu K, Xu T, Wang Q, et al. Validated LC-MS/MS method for quantitation of solasodine in rat urine and feces: Blocking nonspecific adsorption. *Acta Chromatogr.* 2023;35(4):319–25. <https://doi.org/10.1556/1326.2022.01079>
11. Hu H, Xiao H, Bao H, Li M, Xue C, Li YT, et al. Tissue distribution comparison of six active ingredients from an *Eucommiae* cortex extract between normal and spontaneously hypertensive rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020;2020:2049059. <https://doi.org/10.1155/2020/2049059>
12. Kusuma Kumari G, Krishnamurthy PT, Ravi Kiran Ammu VVV, Vishwanath K, Narendran ST, Babu B, Krishnaveni N. Development and validation of a sensitive LC-MS/MS method for pioglitazone: Application towards pharmacokinetic and tissue distribution study in rats. *RSC Adv.* 2021;11(19):11437–43. <https://doi.org/10.1039/d1ra01126j>
13. Khokhlov AL, Yaichkov II, Shetnev AA, Ivanovsky SA, Korsakov MK, Alexeev MA, et al. Identification and synthesis of metabolites of the new antiglaucoma drug. *Res Results Pharmacol.* 2024;10(1):53–66. <https://doi.org/10.18413/rpharmacology.10.431>

Дополнительная информация. На сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» размещены таблицы 4–6.

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-697-table4>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-697-table5>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-697-table6>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *И.И. Яичков* – разработка и валидация биоаналитических методик, анализ образцов биоматериала животных, статистическая обработка данных, написание текста рукописи; *А.Л. Хохлов* – критическое обсуждение и утверждение окончательного варианта статьи для публикации; *М.К. Корсаков* – критическое обсуждение и редактирование текста рукописи; *Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов, В.Е. Зайкова, О.Э. Лазарянц* – проведение работ с лабораторными животными.

Соответствие принципам этики. Проведение исследования было одобрено этическим комитетом ЯГПУ им. К.Д. Ушинского (протокол № 2 от 10.10.2023).

Additional information. Tables 4–6 are published on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*.

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-697-table4>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-697-table5>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-697-table6>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Ilya I. Yaichkov* developed and validated the bioanalytical procedures, analysed animal samples, conducted statistical processing of the data, and drafted the manuscript. *Alexander L. Khokhlov* participated in the critical discussion of the manuscript and approved the final version for publication. *Mikhail K. Korsakov* participated in the critical discussion and editing of the manuscript. *Nikita N. Volkhin, Sergey S. Petukhov, Valeria E. Zaykova, and Olga E. Lazariants* carried out the experiments in laboratory animals.

Ethics approval. This study was approved by the Ethics Committee at the Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky (Approval No. 2 of 10 October 2023).

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Яичков Илья Игоревич, канд. фарм. наук / **Ilya I. Yaichkov**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0066-7388>

Хохлов Александр Леонидович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН / **Alexander L. Khokhlov**, Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0032-0341>

Корсаков Михаил Константинович, д-р хим. наук, доцент / **Mikhail K. Korsakov**, Dr. Sci. (Chem.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0913-2571>

Вольхин Никита Николаевич / **Nikita N. Volkhin**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4275-9037>

Петухов Сергей Станиславович / **Sergey S. Petukhov**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8435-7689>

Зайкова Валерия Евгеньевна / **Valeria E. Zaykova**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-9431-1980>

Лазарянц Ольга Эммануиловна / **Olga E. Lazariants**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1249-3669>

Поступила 20.09.2024

После доработки 10.11.2024

Принята к публикации 04.12.2024

Online first 07.02.2025





Received 20 September 2024

Revised 10 November 2024

Accepted 4 December 2024

Online first 7 February 2025



И.А. Проскурина 
Т.Е. Горская 
Р.С. Ильин 
Д.В. Горячев 

Планирование программы клинических исследований лекарственных препаратов для очищения кишечника (обзор)

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Горская Татьяна Евгеньевна; gorskayate@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В подготовке к диагностическим процедурам и хирургическим вмешательствам на толстом кишечнике важную роль играет очищение кишечника. Одним из основных факторов, обеспечивающих качественное очищение кишечника, является правильный выбор лекарственного препарата (ЛП), оказывающего воздействие на кишечное содержимое и удаляющего его из организма. Актуальной является разработка новых эффективных ЛП для очищения кишечника, характеризующихся хорошей переносимостью и благоприятным профилем безопасности. Рекомендации по планированию программы клинических исследований (КИ) ЛП для очищения кишечника в настоящее время в Российской Федерации и в других странах ЕАЭС отсутствуют.

ЦЕЛЬ. Подготовка рекомендаций по планированию программы клинических исследований лекарственных препаратов для очищения кишечника.

ОБСУЖДЕНИЕ. Проведен анализ основных положений руководства Европейского агентства по лекарственным средствам (ЕМА) по проведению КИ новых ЛП для очищения кишечника; даны рекомендации по проведению фармакологических исследований и подтверждающих КИ (дизайн, популяция исследования, критерии оценки эффективности и безопасности), а также проведению КИ у детей и пациентов пожилого возраста. Особенности КИ ЛП для очищения кишечника: в исследование включают пациентов с заболеванием кишечника, не имеющих иных заболеваний; дизайн подтверждающих КИ III фазы – рандомизированные, с активным контролем, в параллельных группах; необходима оценка безопасности при однократном применении ЛП, долгосрочные исследования безопасности не требуются.





ВЫВОДЫ. Основные методологические подходы, изложенные в Руководстве ЕМА по проведению КИ ЛП для очищения кишечника, позволяют оценить эффективность и безопасность указанных ЛП и могут быть взяты за основу при подготовке рекомендаций к планированию программы КИ ЛП препаратов для очищения кишечника.

Ключевые слова: очищение кишечника; клиническое исследование; лекарственный препарат; солевые слабительные средства; слабительные средства; полиэтиленгликоль; эффективность; безопасность; руководство; Европейское агентство по лекарственным средствам; ЕМА; разработка лекарственных средств

Для цитирования: Проскурина И.А., Горская Т.Е., Ильин Р.С., Горячев Д.В. Планирование программы клинических исследований лекарственных препаратов для очищения кишечника (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(5):521–532. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-5-521-532>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022300127-0).

Потенциальный конфликт интересов. Д.В. Горячев является членом редакционной коллегии журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» с 2018 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Irina A. Proskurina 
Tatiana E. Gorskaya 
Roman S. Ilin 
Dmitry V. Goryachev 

Planning Clinical Trial Programme for Bowel Cleansing Medicinal Products (Review)

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ **Tatiana E. Gorskaya**; gorskayate@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Colon cleansing plays an essential role in preparation for diagnostic procedures and surgical interventions. One of the key factors ensuring high-quality colon cleansing is the correct choice of a medicinal product that affects the intestinal contents and removes them from the body. Planning and conducting clinical trials for new effective colon cleansing medicines that are well-tolerated and have a favourable safety profile is an urgent task for health care. Currently, there are no regulatory documents on planning a clinical trial programme for colon cleansing medicinal products in the Russian Federation or the Eurasian Economic Union.

AIM. This study aimed to prepare recommendations for planning a clinical trial programme for bowel cleansing medicinal products.

DISCUSSION. Main provisions of the Guidelines of European Medicines Agency (EMA) were analysed for new medicinal products used in chronic constipation. The Guidelines define specific conditions for pharmacological studies and confirmatory clinical trials (regarding choice of design, study population, criteria for assessing efficacy and safety), as well as specific requirements for clinical trials in paediatric and elderly patients. Particular features of clinical trials for bowel cleansing medicines include patients with no comorbidities other than bowel disease; confirmatory clinical trials designed as randomised, active-control studies in parallel groups; safety assessment for a single-use medicinal product; long-term safety studies not required.

CONCLUSIONS. The main research models described in EMA Guidelines on clinical trials of bowel cleansing medicinal products enable a reliable assessment of safety and efficacy of the above medicines and can serve to prepare guidelines on clinical trial planning for bowel cleansing medicinal products.

Keywords: bowel cleansing; clinical trial; medicinal product; saline laxatives; laxatives; polyethylenglycol; PEG; efficacy; safety; guidelines; European Medicines Agency; EMA; medicine development

For citation: Proskurina I.A., Gorskaya T.E., Ilin R.S., Goryachev D.V. Planning clinical trial programme for bowel cleansing medicinal products (Review). *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(5):521–532. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-5-521-532>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00001-25-00 (R&D Registry No. 124022300127-0).

Disclosure. Dmitry V. Goryachev has been a member of the Editorial Board of *Regulatory Research and Medicine Evaluation* since 2018. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Основными методами диагностики и дифференциальной диагностики заболеваний толстого кишечника являются эндоскопические исследования, позволяющие провести детальную визуализацию слизистой оболочки толстой кишки, что дает возможность на ранних стадиях выявить различные патологические изменения, в том числе злокачественные, а также провести биопсию и малоинвазивные лечебные вмешательства во время процедуры [1].

По данным ВОЗ, в 2022 г. одной из наиболее часто встречающихся форм рака являлся колоректаль-

ный рак, занимая третье место по заболеваемости и второе место по смертности от онкологических заболеваний в мире¹. В 2023 г. в Российской Федерации было зарегистрировано 47 630 новых случаев рака ободочной кишки и 33 080 новых случаев рака прямой кишки, смертность по этой причине составила, соответственно, 21 240 и 14 401 человек [2, 3]. Выявить это заболевание на ранних этапах и снизить смертность от него позволяет проведение скрининговой колоноскопии [4, 5].

Эффективность колоноскопии зависит от качества осмотра слизистой оболочки толстой кишки, так как остатки кишечного содержимого

¹ [World Health Organization. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. 2024.](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/global-trends-in-cancer)

могут скрывать новообразования и другие изменения толстой кишки [6, 7]. Хорошее очищение кишечника улучшает визуализацию слизистой оболочки кишечника, что позволяет выявить мельчайшие патологические изменения и повышает точность диагностики. Недостаточная подготовка пациента в 6–27% приводит к ложноотрицательным результатам эндоскопического обследования [1, 8]. Кроме того, неадекватное очищение кишечника может привести к увеличению времени исследования, его незавершенности и необходимости повторного проведения колоноскопии [9].

Одним из основных факторов, обеспечивающих качественное очищение кишечника перед проведением диагностических исследований и хирургических вмешательств, является правильный выбор ЛП, оказывающего воздействие на кишечное содержимое и удаляющего его из организма [9]. Этим обусловлена необходимость разработки ЛП для очищения кишечника, обладающих хорошей переносимостью и благоприятным профилем безопасности.

Методические документы по планированию программы клинических исследований (КИ) ЛП для очищения кишечника в настоящее время в Российской Федерации и в других странах Евразийского экономического союза (ЕАЭС) отсутствуют. В странах Европейского союза таким нормативным документом является руководство Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) по проведению КИ ЛП для очищения кишечника².

Цель работы – подготовка рекомендаций по планированию программы клинических исследований лекарственных препаратов для очищения кишечника.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Методы подготовки толстого кишечника к диагностическим и хирургическим вмешательствам

Одним из первых методов очищения кишечника был механический способ, состоящий в постановке сифонных клизм в сочетании с диетическими ограничениями и применением слабительных ЛП в высоких дозах. Этот метод требует создания специальных условий, имеет ряд противопоказаний, неприятен и неудобен для пациентов

и недостаточно эффективен, так как не обеспечивает должной визуализации слизистой оболочки толстой кишки³ [8, 10]. В дальнейшем для очищения кишечника применялся метод перорального лаважа кишечника большим объемом (7–12 л) раствора электролитов или прерывистое орошение прямой кишки большим объемом жидкости (20–22 л) в сочетании с солевыми слабительными ЛП. Данный метод также имеет существенные недостатки в связи с большой длительностью проведения, плохой субъективной переносимостью пациентами, а также ограничением к применению у пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой, дыхательной, пищеварительной и мочевыделительной систем из-за нарушения водно-электролитного обмена и недостаточности кровообращения⁴ [10].

В настоящее время стандартный метод подготовки толстой кишки к диагностическим и хирургическим вмешательствам заключается в соблюдении определенного режима питания и применении ЛП для очищения кишечника. Основу стандартного метода подготовки к очищению кишечника составляет бесшлаковая диета, не содержащая клетчатку. Ее следует соблюдать в течение 2–3 дней до начала исследования и сочетать с приемом прозрачных жидкостей накануне исследования⁵.

ЛП, применяемые для очищения кишечника перед диагностическим или хирургическим вмешательством, классифицируют по составу действующих веществ, объему принимаемого раствора ЛП и схеме применения.

В зависимости от состава действующих веществ ЛП делят на электролитные слабительные на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ), обладающие изоосмотическим действием, и солевые слабительные (сульфаты, фосфаты), обладающие гиперосмотическим действием [11]. Препараты этих групп различаются по механизму действия и, следовательно, по эффективности подготовки [6].

По объему принимаемого раствора различают высокообъемные и малообъемные ЛП. Современные схемы применения ЛП для очищения кишечника включают вечернюю схему (для большинства ЛП), двухэтапную схему применения ЛП для очищения кишечника (для всех современных ЛП) и утреннюю схему (для препарата ПЭГ с аскорбиновой кислотой).

² EMA/CHMP/336243/2013. Guideline on the evaluation of medicinal products for the treatment of chronic constipation (including opioid induced constipation) and for bowel cleansing. CHMP; 2015.

³ Подготовка пациентов к эндоскопическому исследованию толстой кишки. Клинические рекомендации. Изд. 3. Российское Эндоскопическое Общество; 2017.

⁴ Там же.

⁵ Там же.

Лекарственные препараты на основе ПЭГ оказывают слабительное действие только в кишечнике, поэтому данная группа ЛП является более безопасной по сравнению с солевыми слабительными, оказывающими системное действие [6, 8]. Результаты КИ показали, что высокообъемные (4 л) растворы ПЭГ эффективно очищают кишечник, однако из-за большого объема раствора и развития тошноты не все пациенты способны принять полный объем препарата [8]. Это снижает приверженность пациента к процедуре и качество очистки толстой кишки. Малообъемные препараты ПЭГ характеризуются эффективностью, сопоставимой с традиционными 4-литровыми растворами ПЭГ, но обладают лучшей переносимостью.

В настоящее время единственным малообъемным ЛП ПЭГ является препарат ПЭГ с аскорбиновой кислотой [12, 13]. Этот препарат эффективен для очищения кишечника у большинства пациентов и показан к применению у пациентов с ожидаемым низким комплаенсом к высокообъемным препаратам ПЭГ для очищения кишечника. Он характеризуется более благоприятным профилем безопасности по сравнению с солевыми слабительными (фосфатами, сульфатами). При его применении отсутствуют риски повреждения слизистой оболочки кишки, развития электролитных расстройств и поражения почек⁶ [6]. Однако у препарата ПЭГ с аскорбиновой кислотой имеются класс-специфические противопоказания, кроме того, его применение противопоказано при дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (в связи с содержанием в составе аскорбиновой кислоты) и фенилкетонурии (в связи с содержанием в составе аспартама)⁷.

Большая часть солевых слабительных не всасывается и оказывает свое действие в толстой кишке, меньшая часть всасывается в тонкой кишке и поступает в системный кровоток [6], в связи с чем ЛП данной группы имеют ограничения к применению. Препараты, содержащие фосфаты, могут вызывать острую фосфатную нефропатию и не рекомендуются при почечной недостаточности вплоть до полного отказа применения подобных ЛП в клинической практике [12, 14].

В связи с опасностью развития водно-электролитных нарушений некоторые солевые слабительные, особенно в больших объемах,

противопоказаны при сердечной недостаточности, аритмиях и других сердечно-сосудистых заболеваниях, а также при проведении анестезии. Сульфаты и фосфаты следует применять с осторожностью у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, почечной и печеночной недостаточностью [9, 15–17]. Фосфаты могут вызывать снижение концентрации магния, кальция (опасность развития судорог) и калия (опасность аритмии и остановки сердца), а также гипернатриемии и гиперфосфатемии [8, 15, 18]. У здоровых лиц фосфаты рекомендуется применять только в случае индивидуальной непереносимости или невозможности применения ЛП на основе ПЭГ.

Все солевые слабительные оказывают выраженное раздражающее действие на слизистую оболочку толстой кишки и могут вызывать схваткообразные боли в животе, что следует учитывать при подготовке пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника⁸ [8]. К группе солевых слабительных препаратов относится также комбинированный препарат, содержащий в качестве действующих веществ натрия пикосульфат и магния цитрат. Очищение кишечника при его применении происходит вследствие мощного «вымывающего» эффекта со стимуляцией перистальтики кишечника. Во избежание обезвоживания во время приема данного препарата рекомендуется соблюдать питьевой режим⁹ [19].

Для достижения должного качества очищения кишечника и профилактики развития водно-электролитных нарушений при применении малообъемных солевых слабительных ЛП рекомендуется употребление дополнительного объема жидкости. Общий объем принятой жидкости в этом случае вместе с раствором малообъемного ЛП может достигать 3–4 л [20].

Выбор конкретной медикаментозной схемы очищения кишечника должен основываться на индивидуальном подходе к пациенту, с учетом показаний и цели исследования [11]. Все режимы применения ЛП подходят для очищения кишечника как перед проведением диагностического обследования, так и перед оперативным вмешательством, но перед оперативными вмешательствами, которые проводятся под наркозом, более предпочтительна вечерняя схема

⁶ Подготовка пациентов к эндоскопическому исследованию толстой кишки. Клинические рекомендации. Изд. 3. Российское Эндоскопическое Общество: 2017.

⁷ https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=eecd5976-8f3e-4252-bd74-ef6a934d3be0

⁸ Подготовка пациентов к эндоскопическому исследованию толстой кишки. Клинические рекомендации. Изд. 3. Российское Эндоскопическое Общество: 2017.

⁹ https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=a4f38060-c3dc-4ab7-8d85-4390254696f1

применения ЛП. Для подготовки к эндоскопическому исследованию толстой кишки предпочтительнее применять двухэтапную и утреннюю схемы применения ЛП [1, 12]. Утренняя схема подготовки к обследованию более удобна для пациента и предпочтительна, если процедура назначена на вторую половину дня (все необходимые препараты для очищения кишечника принимаются утром в день процедуры) [21]. К ЛП с утренней схемой применения относится только один ЛП – препарат ПЭГ с аскорбиновой кислотой [13].

Очищение кишечника у детей. Подготовка кишечника к эндоскопическому исследованию у детей должна быть безопасной, учитывать возраст пациента, его клиническое состояние, желание и возможность соблюдать бесшлаковую диету, а применяемые ЛП должны обладать приятным вкусом¹⁰ [22].

По литературным данным, у детей старше 2 лет за рубежом применяют кишечный лаваж с помощью препаратов на основе ПЭГ, слабительные ЛП или клизмы. У детей в возрасте до 2 лет в качестве метода подготовки к колоноскопии используется прием прозрачных жидкостей без сахара за день до колоноскопии, полное воздержание от пищи и питья за 8 ч до исследования в сочетании с очистительными клизмами¹¹. Единственным официально разрешенным к медицинскому применению в Российской Федерации слабительным ЛП у детей с 1 года является комбинированный препарат на основе натрия пикосульфата и магния цитрата¹². Применение ЛП для очищения кишечника на основе фосфатов и на основе ПЭГ у детей в возрасте до 18 лет противопоказано¹³.

Очищение кишечника у лиц пожилого возраста. Неудовлетворительная подготовка толстой кишки у лиц пожилого возраста наблюдается в 16–21% случаев, что требует индивидуального выбора схемы подготовки толстой кишки в зависимости от возраста и клинического состояния. Подготовка к колоноскопии у людей пожилого возраста требует особого внимания к диете и выбору ЛП для очищения кишечника.

Предпочтительнее использовать двухэтапную схему подготовки. Важно соблюдать рекомендуемый питьевой режим для профилактики обезвоживания, особенно при приеме слабительных. При склонности к запорам с целью улучшения очищения кишечника у лиц пожилого возраста рекомендуется соблюдение бесшлаковой диеты в течение более длительного времени, за несколько дней до исследования необходимо применение слабительных ЛП и пеногасителей для снижения газообразования. При наличии у пациента хронических заболеваний возможны изменения в схеме подготовки. В некоторых случаях возможно сокращение времени подготовки и продолжительности бесшлаковой диеты¹⁴. Препаратами выбора при подготовке к очищению кишечника у лиц пожилого возраста являются ЛП на основе ПЭГ, поскольку у них даже при нормальном клиренсе креатинина при применении фосфатов повышен риск развития фосфатной интоксикации, особенно при сопутствующих системных заболеваниях¹⁵.

Исследования лекарственных препаратов для очищения кишечника. Количество эффективных и безопасных ЛП для очищения кишечника, применяемых у взрослых и у детей, в настоящее время ограничено. Доступные в настоящее время ЛП для очищения кишечника обладают теми или иным недостатками, ограничивающими их применение у пациентов различных групп. К снижению эффективности ЛП для очищения кишечника приводит также нарушение режима его приема из-за специфических вкусовых качеств, а также необходимости приема большого объема раствора и плохой переносимости [23].

В связи с этим в настоящее время продолжают исследования по оптимизации процессов подготовки к очищению кишечника. Проводится изучение схем очищения кишечника с применением препаратов на основе ПЭГ в меньших объемах с целью улучшения их переносимости [24]. Разработан ЛП для очищения кишечника на основе ПЭГ объемом 1 л. Результаты рандомизированного многоцентрового КИ фазы III показали не меньшую эффективность данного ДП по сравнению с ЛП на основе трисульфата

¹⁰ Подготовка пациентов к эндоскопическому исследованию толстой кишки. Клинические рекомендации. Изд. 3. Российское Эндоскопическое Общество; 2017.

¹¹ Там же.

¹² https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=a4f38060-c3dc-4ab7-8d85-4390254696f1

¹³ <https://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx?RegNumber=&MnnR=&lf=&TradeNmR=%d0%ad%d0%bd%d0%b4%d0%be%d0%bb%d0%b0%d0%ba%d1%81%d0%be%d1%84%d1%84&OwnerName=&MnfOrg=&MnfOrgCountry=&isfs=0®type=1%2c2%2c3%2c4%2c5%2c6%2c7%2c8&pageSize=10&token=88c77649-79df-48b3-93dd-1fecdfb8f718&order=Registered&orderType=desc&pageNum=1>

¹⁴ Подготовка пациентов к эндоскопическому исследованию толстой кишки. Клинические рекомендации. Изд. 3. Российское Эндоскопическое Общество; 2017.

¹⁵ Там же.

(комбинации сульфатных солей натрия, калия и магния). Оба препарата продемонстрировали схожие общие профили переносимости и безопасности [25].

С целью улучшения переносимости разработаны таблетированные ЛП для очищения кишечника на основе сульфатов. Результаты КИ, на основании которых ЛП одобрены за рубежом к медицинскому применению у взрослых, свидетельствуют о не меньшей эффективности данных препаратов и лучшей переносимости по сравнению с двухлитровым препаратом ПЭГ с аскорбиновой кислотой [26, 27].

В ряде случаев при проведении процедуры очищения кишечника сократить объем основного препарата или улучшить качество подготовки к исследованию позволяет дополнительное применение стимулирующих слабительных и пеногасителей [23, 28]. Разрабатываются комбинированные таблетированные ЛП для очищения кишечника на основе сульфатов, в состав действующих веществ которых включен симетикон. Показана лучшая переносимость данных ЛП по сравнению с ЛП на основе ПЭГ [29, 30], в том числе и у лиц пожилого возраста [31].

Предпринимаются попытки по улучшению органолептических качеств ЛП для очищения кишечника, например с помощью ароматизаторов и ферментируемых углеводов [32]. Однако улучшение вкуса не всегда приводит к повышению переносимости препарата, кроме того, при включении в состав ЛП ферментируемых углеводов возможна их метаболизация во взрывоопасный газ¹⁶.

В результате длительного опыта применения различных методов подготовки кишечника к колоноскопии сформулированы основные требования к выбору оптимального метода очищения кишечника, которые актуальны в настоящее время¹⁷ [33]:

- эффективность;
- безопасность, отсутствие нежелательных реакций со стороны других органов и систем; отсутствие изменения водно-электролитного баланса, отсутствие чувства дискомфорта у пациента, хорошая переносимость;
- отсутствие влияния на тяжесть заболевания кишечника;
- отсутствие изменений слизистой оболочки толстой кишки;

- короткий (не более суток) период подготовки;
- возможность самостоятельного выполнения процедуры подготовки пациентом, в том числе в домашних условиях, или при минимальном участии медицинского персонала;
- отсутствие искажений эндоскопического изображения (цвета, контуров, отражения и т.п.);
- возможность применения витальных красителей или других видов эндоскопической диагностики и лечения (коагуляции, лазера, фотодинамической терапии и т.п.);
- отсутствие повреждающего действия на эндоскопическое оборудование;
- возможность контроля проведения манипуляции, в том числе возможность прекращения манипуляции в случае возникновения непереносимости, осложнения или нежелательных реакций;
- приемлемая стоимость.

Программа клинических исследований лекарственных препаратов для очищения кишечника

Учитывая особенности формирования нормативно-правового пространства в странах – членах ЕАЭС [34, 35], рациональным вариантом решения вопроса гармонизации методологических подходов к проведению клинических исследований ЛП для очищения кишечника следует считать взятие за основу руководства ЕМА с внесением в него ряда дополнений с учетом современных требований к проведению доказательных КИ новых ЛП, опыта проведения КИ ЛП для очищения кишечника и российских клинических рекомендаций и стандартов по подготовке пациентов к эндоскопическому исследованию толстой кишки.

В соответствии с Руководством ИСН по общим вопросам проведения клинических исследований, программа КИ нового (оригинального) ЛП включает фармакологические исследования (I фаза), поисковые терапевтические КИ (II фаза), подтверждающие терапевтические КИ (III фаза)¹⁸.

Фармакологические исследования. При изучении фармакокинетики ЛП для очищения кишечника ключевое значение имеет оценка абсорбции и элиминации, особенно важная для осмотических слабительных. Необходимо проведение исследования влияния почечной недостаточности

¹⁶ Подготовка пациентов к эндоскопическому исследованию толстой кишки. Клинические рекомендации. Российское Эндоскопическое Общество: 2017.

¹⁷ Там же.

¹⁸ CPMP/ICH/291/95. Note for guidance on general considerations for clinical trials. EMA; 1998.

на выведение ЛП [36]. Также необходимо провести исследование потенциальных лекарственных взаимодействий (например, с диуретиками).

При изучении фармакодинамики ЛП для очищения кишечника следует провести изучение его влияния на моторику кишечника. Основное внимание при ранней оценке данных ЛП необходимо уделять не только влиянию на транзит по толстой кишке, но, в большей степени, влиянию на индукцию диареи этими ЛП¹⁹.

На данном этапе клинических исследований необходимо проведение изучения воздействия ЛП на водно-электролитный баланс (определение концентрации ионов электролитов (натрия, калия, хлора) в сыворотке крови), особенно при изучении фосфатных препаратов, которые могут вызывать гипокальциемию и гиперфосфатемию [8, 17, 18].

Поступление большого количества жидкости в кишечник может оказывать влияние на сердечно-сосудистую систему (артериальное давление, частоту сердечных сокращений) и функцию почек (изменение расчетной скорости клубочковой фильтрации); на химический состав сыворотки крови (электролиты, включая магний, фосфор и кальций; рН и кислотно-щелочной баланс), а также на состав жидкостей организма, таких как кишечное содержимое и моча (общее количество/масса, осмоляльность, концентрацию электролитов, состав, водный баланс)²⁰. На ранних стадиях разработки ЛП для очищения кишечника необходим мониторинг всех указанных функций.

Поисковые клинические исследования. Рекомендации по проведению поисковых исследований новых ЛП для очищения кишечника в Руководстве ЕМА отсутствуют. При проведении поисковых ИИ данных ЛП необходимо руководствоваться как общими принципами проведения данных ИИ²¹, так и учитывать особенности данной группы ЛП.

Определение оптимальной дозы:

- сравнение различных объемов препарата (например, 2 л по сравнению с 4 л ПЭГ);
- оценка эффективности раздельных и однократных схем приема ЛП.

Оптимизация режима приема:

- исследование различных временных интервалов между приемом препарата и процедурой;
- оценка влияния дополнительных компонентов (прокинетики, ароматизаторы).

Разработка объективных критериев оценки:

- валидация шкал оценки качества очищения;
- разработка стандартизированных опросников переносимости.

Важным аспектом на данном этапе клинических исследований является стратификация пациентов по степени риска недостаточного очищения (пациенты пожилого возраста, пациенты с хроническим запором) [19].

Подтверждающие клинические исследования

Целью подтверждающих ИИ новых ЛП для очищения кишечника является изучение и оценка их эффективности и безопасности в сравнении с препаратом активного контроля.

Целевая популяция. Субъекты, включаемые в ИИ ЛП для очищения кишечника перед диагностическими процедурами, требующими очищения кишечника (обычно колоноскопии), должны быть здоровыми, за исключением соответствующего основного заболевания или состояний, являющихся показаниями к проведению планового исследования²². В ИИ должны быть включены мужчины и женщины в возрасте старше 18 лет, имеющие показания к проведению диагностической колоноскопии. В соответствии со стандартами качественной колоноскопии показаниями к проведению плановой диагностической колоноскопии являются [6]:

- выявленные по результатам рентгенологического исследования толстой кишки (ирригоскопии) изменения (КРР или подозрение на КРР, стриктуры, несоответствие между данными ирригоскопии и клинической картиной заболевания);
- установление сопутствующей или вторичной патологии толстой кишки в случае выявления полипов верхних отделов желудочно-кишечного тракта или дистального отдела толстой кишки;
- жалобы и клинические признаки, характерные для поражения толстой кишки (нарушение акта дефекации — запоры, поносы,

¹⁹ ЕМА/СНМР/336243/2013. Guideline on the evaluation of medicinal products for the treatment of chronic constipation (including opioid induced constipation) and for bowel cleansing. СНМР; 2015.

²⁰ Там же.

²¹ Рекомендация Коллегии ЕЭК от 12.03.2019 № 8 «О Руководстве по подбору дозы лекарственных препаратов». СРМР/ИЧН/378/95. Note for guidance on dose response information to support drug registration. ЕМА; 1994.

²² ЕМА/СНМР/336243/2013. Guideline on the evaluation of medicinal products for the treatment of chronic constipation (including opioid induced constipation) and for bowel cleansing. СНМР; 2013.

неустойчивый стул); выделение крови при акте дефекации, патологические примеси в кале (слизь, гной), положительный анализ кала на скрытую кровь, анемия неясного генеза.

Критерием включения также является согласие пациентов соблюдать стандартизированную бесшлаковую диету, не содержащую клетчатку, в течение 2–3 дней перед исследованием, и принимать прозрачные жидкости накануне исследования. При хроническом запоре диетические ограничения следует соблюдать в течение 5 дней²³ [6].

К критериям не включения относятся:

- отказ пациента от выполнения исследования;
- гиперчувствительность к действующим или любому из вспомогательных веществ препарата;
- беременность и период грудного вскармливания.

Также к критериям не включения относятся все абсолютные противопоказания к эндоскопическому исследованию толстой кишки, к которым, в соответствии со стандартами качественной колоноскопии [4], относятся:

- тяжелые сердечно-сосудистые заболевания, тяжелые степени сердечно-сосудистой, легочной и смешанной недостаточности при ишемической болезни сердца и пороках сердца в стадии декомпенсации, при массивных эмболиях легочной артерии; аневризма аорты или сердца; нарушения сердечного ритма;
- тяжелые клинические формы (молниеносные, фульминантные) воспалительных заболеваний толстой кишки (язвенный колит, болезнь Крона, ишемический колит, радиационный колит, дивертикулит);
- острые воспалительные инфильтраты брюшной полости, включая дивертикулит;
- подозрение на абсцесс брюшной полости;
- инфекционные заболевания (вирусные гепатиты, инфекционные колиты, ВИЧ-инфекция, СПИД).

Противопоказаниями к подготовке кишечника также являются перфорации и парез желудка.

Однако при исключении из КИ пациентов с сопутствующими заболеваниями, такими

как сердечно-сосудистые заболевания, заболевания почек и (или) печени, трудно сделать вывод об общей безопасности этой процедуры у субъектов, которым необходимо чаще всего проходить такие обследования²⁴. Поэтому после подтверждения эффективности и безопасности ЛП для очищения кишечника у здоровых субъектов целесообразно рассмотреть вопрос о проведении КИ у пациентов группы риска.

Определение размера выборки пациентов КИ ЛП для очищения кишечника должно быть статистически обосновано²⁵ [37].

Дизайн. Подтверждающие КИ III фазы ЛП для очищения кишечника должны быть многоцентровыми сравнительными рандомизированными, активно контролируемые в параллельных группах. В качестве активного контроля должен быть выбран стандартный ЛП для очищения кишечника с доказанной эффективностью и безопасностью. Применение плацебо невозможно или не может быть этически оправдано. Слепление (маскировку) следует включать в дизайн КИ, когда это возможно, но это может быть невозможным, если, например, при определенных режимах необходимо вводить разный объем раствора²⁶.

В большинстве КИ используется гипотеза не меньшей эффективности исследуемого ЛП по сравнению с активным контролем. Должна быть подтверждена не меньшая эффективность нового ЛП по сравнению с активным контролем²⁷.

Критерии оценки эффективности

Первичная конечная точка. Для оценки эффективности очищения кишечника используются валидированные шкалы. В Руководстве ЕМА рекомендуется использовать следующие частично валидированные шкалы: Бостонскую шкалу (Boston Bowel Preparation Scale, BBPS), шкалу Оттава (Ottawa Bowel Preparation Scale), шкалу Арончика и шкалу Хэрфилда²⁸ [36–39]. Несмотря на то что данные шкалы были предложены достаточно давно, в настоящее время они не потеряли свою актуальность и широко используются в клинической практике и в КИ. Результаты работы [42] показали, что наиболее тщательно валидированной является Бостонская шкала. Ее

²³ Подготовка пациентов к эндоскопическому исследованию толстой кишки. Клинические рекомендации. Российское Эндоскопическое Общество: 2017.

²⁴ ЕМА/СНМР/336243/2013. Guideline on the evaluation of medicinal products for the treatment of chronic constipation (including opioid induced constipation) and for bowel cleansing. СНМР; 2015.

²⁵ Рекомендации Коллегии ЕЭК от 03.11.2020 № 19 «О Руководстве по применению принципов биостатистики в клинических исследованиях лекарственных препаратов».

²⁶ ЕМА/СНМР/336243/2013. Guideline on the evaluation of medicinal products for the treatment of chronic constipation (including opioid induced constipation) and for bowel cleansing. СНМР; 2015.

²⁷ Там же.

²⁸ Там же.

рекомендуется использовать в КИ и повседневной практической работе.

Для оценки эффективности очищения кишечника в КИ возможно использовать не одну шкалу, а несколько. Выбор шкалы, которая будет использоваться для оценки первичной конечной точки, во всех случаях должен быть обоснован²⁹.

В КИ ЛП для очищения кишечника адекватную (успешную полную подготовку) принято определять как результат общей оценки по Бостонской шкале ≥ 6 баллов при условии, что в каждом из трех оцениваемых сегментов подготовка была не менее 2 баллов [43, 44]. Первичной конечной точкой при этом будет являться доля пациентов с адекватным очищением кишечника (≥ 6 баллов по Бостонской шкале). Эффективность очищения кишечника следует оценивать путем оценки очистки всей толстой кишки.

Вторичные конечные точки. Поскольку обычно описанные выше инструменты содержат порядковые шкалы оценки различных сегментов толстой кишки, в качестве основной вторичной конечной точки следует использовать сегментную оценку чистоты кишечника по Бостонской шкале для каждого отдела толстой кишки (с акцентом на правые отделы).

Дополнительные вторичные конечные точки могут включать оценку³⁰ [43, 44]:

- частоты завершения колоноскопии в полном объеме;
- общего времени проведения колоноскопии;
- частоты выявления полипов (или другой патологии);
- оценку удовлетворенности исследователя качеством подготовки по шкале Лайкерта и комплаенсом пациентов (комплаенс пациентов рассчитывается по результатам измерения количества неиспользованного препарата и потребленной жидкости, зарегистрированной пациентом на информационном листке-вкладыше);
- приемлемости органолептических свойств ЛП для пациентов с помощью опросников о вкусовых качествах, готовности к повторному приему и исследованиях.

Клинические исследования в особых группах пациентов. Поскольку в настоящее время

ассортимент ЛП, которые могут применяться для очищения кишечника у детей в возрасте до 18 лет, ограничен, существует необходимость в разработке и проведении КИ новых подобных ЛП. При этом большое внимание следует уделять разработке лекарственных форм, соответствующих возрасту и массе тела ребенка³¹.

КИ ЛП для очищения кишечника у детей необходимо проводить с учетом общих принципов проведения КИ в педиатрической популяции³². Рекомендуется включить детей всех возрастных групп от 0 до 18 лет³³. Возрастную стратификацию следует провести по группам: дети в возрасте 2–6; 7–12; 13–17 лет. В остальном выбор критериев включения/невключения соответствует таковым при проведении КИ ЛП для очищения кишечника у взрослых. Дизайн исследования, основные критерии оценки эффективности и безопасности также соответствуют таковым при проведении КИ ЛП для очищения кишечника у взрослых.

Методы очищения кишечника у детей должны учитывать особенности детского организма, в том числе в части использования общей анестезии (и, как следствие, необходимости введения ЛП для очищения кишечника за один день до колоноскопии) и зондов для кормления.

В случае разработки новой комбинации хорошо известных ЛС возможно экстраполировать эффективность монопрепаратов на комбинацию и провести только открытое КИ по изучению безопасности. Степень экстраполяции должна быть обоснована³⁴.

Лицам пожилого возраста необходимо проходить процедуры скрининга толстой кишки чаще, чем пациентам в возрасте до 60 лет, поэтому диагностические исследования, требующие очищения кишечника, у них проводятся чаще. Другой особенностью этой группы пациентов является полифармакотерапия, поэтому повышается риск лекарственного взаимодействия при совместном применении ЛП.

Таким образом, включение в КИ пациентов старшего возраста является обоснованным³⁵. Количественное соотношение пациентов разных возрастов должно соответствовать естественному распределению возрастных групп.

²⁹ Там же.

³⁰ Там же.

³¹ ЕМА/СНМР/336243/2013. Guideline on the evaluation of medicinal products for the treatment of chronic constipation (including opioid induced constipation) and for bowel cleansing. СНМР; 2015.

³² ICH E11(R1). Guideline on clinical investigation of medicinal products in the pediatric population. ЕМА; 2018.

³³ Там же.

³⁴ ЕМА/СНМР/336243/2013. Guideline on the evaluation of medicinal products for the treatment of chronic constipation (including opioid induced constipation) and for bowel cleansing. СНМР; 2015.

³⁵ Там же.

При проведении КИ у лиц пожилого возраста необходимо учитывать следующие факторы: возможные отличия в фармакокинетике по сравнению с молодыми пациентами; снижение функции почек; наличие риска дегидратации; наличие сопутствующей патологии; необходимость исключения тяжелой сердечной недостаточности; необходимость контроля электролитов при приеме диуретиков. Также необходимо проводить оценку когнитивных функций при выполнении рекомендаций по проведению подготовки к очищению кишечника [20].

Оценка безопасности. Исследования безопасности при длительном применении ЛП для очищения кишечника не требуются, поскольку эти препараты обычно назначаются крайне редко на протяжении значительного временного периода. Однако следует уделить внимание регистрации нежелательных явлений при однократном применении, особенно аллергических реакций, электролитных нарушений, сердечно-сосудистых осложнений у лиц пожилого возраста.

Особое внимание следует уделить включению в исследование особых групп пациентов. В зависимости от механизма действия ЛП в такие группы могут войти пациенты с печеночной и почечной недостаточностью, сердечно-сосудистыми заболеваниями и ранее установленными заболеваниями кишечника³⁶.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методологические подходы Руководства ЕМА по проведению КИ ЛП для очищения кишечника могут быть взяты за основу при подготовке

рекомендаций к планированию программы КИ ЛП препаратов для очищения кишечника в Российской Федерации и других странах ЕАЭС, с учетом современных требований к проведению доказательных КИ новых ЛП, опыта проведения КИ ЛП для очищения кишечника и актуальных российских клинических рекомендаций и стандартов по подготовке пациентов к эндоскопическому исследованию толстой кишки.

Среди стандартных требований, предъявляемых к проведению КИ ЛП, следует особо выделить те, которые отражают специфику ЛП для очищения кишечника, в том числе:

- пациенты, включаемые в КИ ЛП для очищения кишечника перед диагностическими процедурами или оперативными вмешательствами, требующими очищения кишечника, должны быть здоровыми, за исключением соответствующего основного заболевания;
- подтверждающие КИ III фазы ЛП для очищения кишечника перед диагностическими процедурами или оперативными вмешательствами, требующими очищения кишечника, должны быть рандомизированными, активно контролируемые в параллельных группах;
- проведение долгосрочных исследований безопасности не требуется, однако необходима оценка безопасности при однократном применении.

Стандартизация методологических подходов к планированию и проведению КИ позволит получать достоверные данные об эффективности и безопасности новых ЛП для очищения кишечника.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Каннер ЕВ, Максимов МЛ, Ермолаева АВ и др. Современные и перспективные способы подготовки кишечника к инструментальным исследованиям. *Амбулаторная хирургия*. 2021;18(1):91–102. Kanner EV, Maximov ML, Ermolaeva AS, et al. Modern and promising ways of bowel preparation for instrumental research. *Ambulatory Surgery (Russia)*. 2021;18(1):91–102 (In Russ.). <https://doi.org/10.21518/1995-1477-2021-18-1-91-102>
2. Кашин СВ, Нехайкова НВ, Завьялов ДВ и др. Скрининг колоректального рака: общая ситуация в мире и рекомендованные стандарты качества колоноскопии. *Доказательная гастроэнтерология*. 2017;(4):32–52. Kashin SV, Nekhaykova NV, Zavyalov DV, et al. The colorectal cancer screening: The current global situation and the main standards for the quality of screening colonoscopy recommended by the European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE). *Russian Journal of Evidence-based Gastroenterology*. 2017;(4):32–52 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/dokgastro20176432-52>
3. Каприн АД, Старинский ВВ, Шахзадова АО, ред. *Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность)*. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2024. Kaprin AD, Starinsky VV, Shakhzadova AO, eds. *Malignant neoplasms in Russia in 2023 (morbidity and mortality)*. Moscow: P.A. Herzen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation; 2024 (In Russ.). <https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2024/08/zis-2023-elektronnaya-versiya.pdf>
4. Tonini V, Zanni M. Why is early detection of colon cancer still not possible in 2023? *World J Gastroenterol*. 2024;30(3):211–24. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i3.211>
5. Bretthauer M, Løberg M, Wieszczy P, et al. Effect of colonoscopy screening on risks of colorectal cancer and related death. *N Engl J Med*. 2022;387(17):1547–56. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2208375>
6. Кашин СВ, Никонов ЕЛ, Нехайкова НВ и др. Стандарты качественной колоноскопии (пособие для врачей). *Доказательная гастроэнтерология*. 2019;8(1–2):3–32. Kashin SV, Nikonov EL, Nekhaykova NV, et al. Standards of quality colonoscopy (Guidelines for doctors). *Russian Journal of Evidence-based Gastroenterology*. 2019;8(1–2):3–32 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/dokgastro20198012003>

³⁶ ЕМА/CHMP/336243/2013. Guideline on the evaluation of medicinal products for the treatment of chronic constipation (including opioid induced constipation) and for bowel cleansing. CHMP; 2015.

7. Галеев АВ, Мтвралашвили ДА, Архипова ОВ и др. Применение энтерального питания в комплексной подготовке пациентов к колоноскопии. *Колопроктология*. 2018;(4):25–30. Galyaev AV, Mtvralashvili DA, Arkhipova OV, et al. The use of enteral nutrition in bowel cleansing before colonoscopy. *Koloproktologia*. 2018;(4):25–30 (In Russ.). <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2018-0-4-25-30>
8. Журавлева МВ, Сереброва СЮ, Пономаренко ТМ и др. Клиническая фармакология препаратов для подготовки к диагностическим исследованиям и оперативным вмешательствам, требующим очищения кишечника: анализ параметров эффективности и безопасности. *Доказательная гастроэнтерология*. 2020;9(1):50–67. Zhuravleva MV, Serebrova SYu, Ponomarenko TM, et al. Clinical pharmacology of drugs for bowel cleansing prior to any diagnostic and/or surgical procedures requiring clean bowel: analysis of efficacy and safety parameters. *Russian Journal of Evidence-based Gastroenterology*. 2020;9(1):50–67 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/dokgastro2020901150>
9. Щербakov ПЛ, Парфенов АИ, Албулова ЕВ. Новые схемы подготовки кишечника к колоноскопии. *Лечащий врач*. 2014;(11):75. Shcherbakov PL, Parfenov AI, Albulova EV. New schemes of preparation of the intestine for colonoscopy. *Lechaschi Vrach*. 2014;(11):75 (In Russ.). EDN: TEWQZD
10. Соловьев МВ, Лукьянчук РМ, Гордиенко АВ, Сорокин НВ. Исторические, современные и перспективные средства и методы подготовки кишечника к инструментальным исследованиям. *Фарматека*. 2018;(13):8–16. Soloviev MV, Lukuanchuk RM, Gordienko AV, Sorokin NV. Historical, modern and perspective agents and methods of preparation of the intestine for special exams. *Farmateka*. 2018;(13):8–16 (In Russ.). <https://doi.org/10.18565/pharmateca.2018.13.8-16>
11. Hagen R, Nguyen MTT, Anderson JC, et al. Navigating bowel preparation for colonoscopy: A comprehensive overview. *J Clin Gastroenterol*. 2025;59(4):285–97. <https://doi.org/10.1097/mcg.0000000000002124>
12. Hassan C, East J, Radaelli F, et al. Bowel preparation for colonoscopy: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. Update 2019. *Endoscopy*. 2019;51(8):775–94. <https://doi.org/10.1055/a-0959-0505>
13. Веселов ВВ, Сидоров АВ, Василюк ВВ и др. Малообъемный раствор препарата ПЭГ с аскорбиновой кислотой для подготовки к колоноскопии по одноэтапной утренней или стандартной двухэтапной (сплит) схемам: Многоцентровое простое слепое рандомизированное контролируемое исследование в параллельных группах. *Колопроктология*. 2017;(25):5–18. Veselov VV, Sidorov AV, Vasiluk VB, et al. Low-volume PEG plus ascorbic acid as bowel preparation for colonoscopy using morning-only dosing regimen compared to standard split-dosing: Multicenter single-blind randomized parallel-group controlled study. *Koloproktologia*. 2017;(25):5–18 (In Russ.). <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2017-0-25-5-18>
14. Кашин СВ, Нехайкова НВ, Видяева НС, Белова АН. Основные положения рекомендаций Европейского общества гастроинтестинальной эндоскопии по подготовке толстой кишки к скрининговой колоноскопии. *Доказательная гастроэнтерология*. 2017;6(3):36–50. Kashin SV, Nekhaykova NV, Vidyayeva NS, Belova AN. The fundamental principles of the European Society of Gastrointestinal Endoscopy guidelines on bowel preparation for screening colonoscopy. *Russian Journal of Evidence-based Gastroenterology*. 2017;6(3):36–50 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/dokgastro20176336-50>
15. Singal AK, Rosman AS, Post JB, et al. The renal safety of bowel preparations for colonoscopy: a comparative study of oral sodium phosphate solution and polyethylene glycol. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27(1):41–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03558.x>
16. Kannankeril P, Roden DM, Darbar D. Drug-induced long QT syndrome. *Pharmacol Rev*. 2010;62(4):760–81. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003723>
17. Casais MN, Rosa-Diez G, Pérez S, et al. Hyperphosphatemia after sodium phosphate laxatives in low risk patients: Prospective study. *World J Gastroenterol*. 2009;15(47):5960–5. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.5960>
18. Patel V, Nicar M, Emmett M, et al. Intestinal and renal effects of low-volume phosphate and sulfate cathartic solutions designed for cleansing the colon: pathophysiological studies in five normal subjects. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(4):953–65. <https://doi.org/10.1038/ajg.2008.124>
19. Поздеев ИВ, Беляев МВ, Шенгелия ЕИ, Парфенюк АВ. Эффективные схемы подготовки кишечника к колоноскопии. Опыт использования препарата пикопреп при подготовке к колоноскопии. *Колопроктология*. 2018;(4):45–9. Pozdeev IV, Belyayev MV, Shengeliya EI, Parfenyuk AV. Effective bowel cleansing for colonoscopy: Picoprep use. *Koloproktologia*. 2018;(4):45–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2018-0-4-45-49>
20. Saltzman JR, Cash BD, Pasha SF, et al. Bowel preparation before colonoscopy. *Gastrointest Endosc*. 2015;81(4):781–94. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2014.09.048>
21. Matro R, Shnitser A, Spodik M, et al. Efficacy of morning-only compared with split-dose polyethylene glycol electrolyte solution for afternoon colonoscopy: A randomized controlled single-blind study. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(9):1954–61. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.160>
22. Hunter A, Mamula P. Bowel preparation for pediatric colonoscopy procedures. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51(3):254–61. <https://doi.org/10.1097/mpg.0b013e3181eb6a1c>
23. Иванова ЕВ, Аникина НЮ, Тихомирова ЕВ и др. Подготовка пациентов к колоноскопии с применением сокращенной дозы полиэтиленгликоля в комбинации со стимулирующим слабительным. *Лечащий врач*. 2015;(9):68. Ivanova EV, Anikina NYu, Tikhomirova EV, et al. Bowel preparation using reduced dosage of polyethylene glycol in combination with stimulant type laxatives. *Lechaschi Vrach*. 2015;(9):68 (In Russ.). EDN: ULSTYR
24. Yoon JY, Kim HG, Cho YS, et al. 1 L-versus 2 L-polyethylene glycol with ascorbic acid for bowel preparation in elderly patients: A randomized multicenter study. *Surg Endosc*. 2022;36(8):5724–33. <https://doi.org/10.1007/s00464-021-08947-4>
25. DeMicco MP, Clayton LB, Pilot J, et al. Novel 1 L polyethylene glycol-based bowel preparation NER1006 for overall and right-sided colon cleansing: A randomized controlled phase 3 trial versus trisulfate. *Gastrointest Endosc*. 2018;87(3):677–87. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2017.07.047>
26. Di Palma JA, Bhandari R, Cleveland M, et al. A safety and efficacy comparison of a new sulfate-based tablet bowel preparation versus a PEG and ascorbate comparator in adult subjects undergoing colonoscopy. *Am J Gastroenterol*. 2021;116(2):319–28. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000001020>
27. Kim JH, Park YE, Kim TO. Comparison of the efficacy and safety between oral sulfate tablet and polyethylene glycol for bowel preparation before colonoscopy according to age. *Medicine (Baltimore)*. 2022;101(27):e29884. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000029884>
28. Пырх АВ, Ивинская ОВ, Широков ИИ. Применение комбинации препаратов полиэтиленгликоля и симетикона в подготовке к рутинной диагностической и лечебной колоноскопии. *Consilium Medicum*. 2017;(2):52–4. Pyrkh AV, Ivinskaya OV, Shirokov II. Application of the combination of polyethyleneglycol and symeticone preparations in the preparation for the route diagnostic and medical colonoscopy. *Consilium Medicum*. 2017;(2):52–4 (In Russ.). EDN: ZTUTER
29. Lee SE, Oh DJ, Nam JH, et al. Taking oral sulfate tablets with simethicone for bowel preparation leads to higher adenoma detection rate than polyethylene glycol: A propensity score analysis. *Dig Dis Sci*. 2023;68(3):867–76. <https://doi.org/10.1007/s10620-022-07611-8>
30. Jung Y, Kim HG, Yang D-H, et al. Efficacy of oral sulfate tablet and 2 L-polyethylene glycol with ascorbic acid for bowel preparation: A prospective randomized KASID

- multicenter trial. *J Korean Med Sci.* 2024;39(48):e301. <https://doi.org/10.3346/jkms.2024.39.e301>
31. Kang HS, Na SY, Yoon JY, et al. Efficacy, tolerability, and safety of oral sulfate tablet versus 2 L-polyethylene glycol/ascorbate for bowel preparation in older patients: Prospective, multicenter, investigator single-blinded, randomized study. *J Gastroenterol.* 2024;59(5):402–10. <https://doi.org/10.1007/s00535-024-02089-9>
 32. Bhandari R, Goldstein M, Mishkin DS, et al. Comparison of a novel, flavor-optimized, polyethylene glycol and sulfate bowel preparation with oral sulfate solution in adults undergoing colonoscopy. *J Clin Gastroenterol.* 2023;57(9):920–7. <https://doi.org/10.1097/mcg.0000000000001894>
 33. Князев МВ, Щербачев ПЛ, Парфенов АИ, Албулова ЕВ. Очищение толстой кишки перед колоноскопией: баланс эффективности, безопасности и восприимчивости препаратов. *Эндоскопическая хирургия.* 2015;21(3):30–6. Knyazev MV, Shcherbakov PL, Parfenov AI, Albulova EV. Colon cleansing before colonoscopy: Balance of effectiveness, safety and accessibility of the medications. *Endoscopic Surgery.* 2015;21(3):30–6 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/endoskop201521330-36>
 34. Маличенко ВС. Гармонизация регулирования обращения технологий здравоохранения в деятельности региональных интеграционных объединений. *Ремедиум.* 2022;26(1):75–81. Malichenko VS. Harmonization of healthcare technologies regulation in frame of regional integration processes. *Remedium.* 2022;(1):75–81 (In Russ.). <https://doi.org/10.32687/1561-5936-2022-26-1-75-81>
 35. Таубэ АА. Некоторые аспекты нормативно-правового регулирования обращения лекарственных средств для медицинского применения в ЕС и ЕАЭС. *Медико-фармацевтический журнал "Пульс".* 2019;21(10):12–9. Taube AA. Some aspects of legal regulation of circulation of medical products for medical use in the EU and the EAEU. *Medical & Pharmaceutical Journal "Pulse".* 2019;21(10):12–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2019-21-10-12-19>
 36. Johnson DA, Barkun AN, Cohen LB, et al. Optimizing adequacy of bowel cleansing for colonoscopy: recommendations from the U.S. multi-society task force on colorectal cancer. *Gastrointest Endosc.* 2014;80(4):543–62. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2014.08.002>
 37. Шредер ОВ, Горячев ДВ, Меркулов ВА. Основные принципы расчета необходимой численности участников клинических исследований. Часть 1. Общие подходы (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2024;14(3):338–50. Shredner OV, Goryachev DV, Merkulov VA. Basic principles for calculating the required number of participants in clinical trials. Part 1. Common approaches (review). *Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2024;14(3):338–50 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-338-350>
 38. Kastenber D, Bertiger G, Brogadir S. Bowel preparation quality scales for colonoscopy. *World J Gastroenterol.* 2018; 24(26):2833–43. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i26.2833>
 39. Calderwood A, Jacobson B. Comprehensive validation of the Boston Bowel Preparation Scale. *Gastrointest Endosc.* 2010;72(4):686–92. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2010.06.068>
 40. Lorenzo-Zúñiga V, Moreno-de-Vega V, Boix J. Preparation for colonoscopy: Types of scales and cleaning products. *Rev Esp Enferm Dig.* 2012;104(8):426–31 (In Spanish). <https://doi.org/10.4321/s1130-01082012000800006>
 41. Cohen LB. Advances in bowel preparation for colonoscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2015;25(2):183–97. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2014.11.003>
 42. Parmar R, Martel M, Rostom A, Barkun AN. Validated scales for colon cleansing: A systematic review. *Am J Gastroenterol.* 2016;111(2):197–204. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.417>
 43. Вологжанина ЛГ, Игумнова ОА, Петухова ИВ, Санников П.К. Эффективная подготовка кишечника к скрининговой колоноскопии. *Колопроктология.* 2020;19(3):65–71. Vologzhanina LG, Igumnova OA, Petukhova IV, Sannikov PK. Effective bowel cleansing for screening colonoscopy. *Koloproktologia.* 2020;19(3):65–71 (In Russ.). <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2020-19-3-65-71>
 44. Федоров ЕД, Веселов ВВ, Кашин СВ и др. Оценка подготовки кишечника малообъемным препаратом на основе сульфатов в сравнении с макроголом: многоцентровое рандомизированное сравнительное клиническое исследование 3-й фазы. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2019;29(2):60–75. Fedorov ED, Veselov VV, Kashin SV, et al. Assessment of bowel preparation using low-volume sulphate-based preparations in comparison with macrogols: A multicenter, randomized, comparative clinical study of the 3rd phase. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology.* 2019;29(2):60–75 (In Russ.). <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2019-29-2-60-75>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: И.А. Проскурина — написание и редактирование текста рукописи, ответственность за все аспекты работы и целостность всех частей статьи; Т.Е. Горская — написание текста рукописи, сбор и систематизация данных литературы; Р.С. Ильин — редактирование текста рукописи; систематизация данных литературы; Д.В. Горячев — разработка концепции исследования, критический пересмотр текста рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Irina A. Proskurina wrote and edited the text, approved study contents, and was in charge of all study aspects and the integrity of all parts of the article. Tatiana E. Gorskaya wrote the text and created a list of references. Roman S. Ilin edited the text and created a list of references. Dmitry V. Goryachev elaborated the study concept, revised the text, and approved the final version.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Проскурина Ирина Анатольевна, канд. мед. наук / Irina A. Proskurina, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0934-5067>

Горская Татьяна Евгеньевна / Tatiana E. Gorskaya

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5430-6975>

Ильин Роман Святославович / Roman S. Ilin

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-2105-7270>

Горячев Дмитрий Владимирович, д-р мед. наук / Dmitry V. Goryachev, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8583-2372>

Поступила 15.07.2025

После доработки 29.07.2025




Принята к публикации 07.08.2025

Received 15 July 2025

Revised 29 July 2025

Accepted 7 August 2025



И.Д. Касымов ✉ 
А.Л. Марченко 
А.В. Басевич 

Разработка состава и технологии матричных таблеток этилтиобензимидазола фумарата в соответствии с заданным профилем высвобождения

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А, Санкт-Петербург, 197376,
Российская Федерация*

✉ Касымов Илья Данисович; kasymov.ilya@pharminnotech.com

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Этилтиобензимидазола фумарат (ЭТБИФ) – актопротекторная и адаптогенная активная фармацевтическая субстанция. Установлено, что эффективность терапии ЭТБИФ достигается при курсовом введении с высокой частотой приема, также отмечены нежелательные действия, связанные с растворением ЭТБИФ в среде желудка. В связи с этим актуальной является разработка матричной лекарственной формы с профилем высвобождения, который позволит нивелировать описанный побочный эффект, снизить частоту приема и тем самым повысить комплаентность к терапии.

ЦЕЛЬ. Разработка состава и технологии матричных таблеток этилтиобензимидазола фумарата в соответствии с заданным профилем высвобождения (полное высвобождение в течение 12 ч, не более 50% ЭТБИФ высвобождается в кислой среде в течение первых 2 ч, оставшееся количество равномерно высвобождается за последующие 10 ч в среде, моделирующей условия кишечника).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Объектом исследования является субстанция этилтиобензимидазола фумарата, а также матричные таблетки с гидроксипропилметилцеллюлозой и этилцеллюлозой на ее основе. Изучены механические свойства таблеток, определены показатели «прочность на раздавливание» и «истираемость». Изучение профилей высвобождения ЭТБИФ проводили в фосфатных буферных средах (рН 1,2; 4,5 и 6,8) с использованием тестера растворения и УФ-спектрометрии.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Изучена кинетика высвобождения ЭТБИФ из матричных систем, содержащих матрицеобразующие агенты с разными принципами образования матрицы. Для составов на основе гидроксипропилметилцеллюлозы удалось достичь пролонгированного высвобождения субстанции ЭТБИФ с 90%-ным высвобождением активной фармацевтической субстанции из таблеток через 12 ч. Для составов с этилцеллюлозой высвобождение субстанции составило от 60 до 90%, при этом в кислой среде высвобождается большая часть ЭТБИФ. Установлено, что введение кислотного агента не влияет на профиль высвобождения ЭТБИФ из матричных таблеток.




ВЫВОДЫ. В ходе исследования разработан состав матричных таблеток, удовлетворяющий заданному профилю высвобождения. Наиболее полное и равномерное высвобождение субстанции в среде, моделирующей условия желудочно-кишечного тракта, достигнуто из матричных таблеток на основе гидроксипропилметилцеллюлозы. Показано, что введение кислотного агента не оказывает влияния на высвобождение ЭТБИФ, несмотря на повышенную растворимость субстанции в кислой среде.

Ключевые слова: матричные таблетки; матрицеобразующие компоненты; этилтиобензимидазола фумарат; кинетика высвобождения; технология; состав; микрокристаллическая целлюлоза; МКЦ; гидроксипропилметил-целлюлоза; гипромеллоза; этилцеллюлоза; разработка лекарственных препаратов; лекарственный препарат

Для цитирования: Касымов И.Д., Марченко А.Л., Басевич А.В. Разработка состава и технологии матричных таблеток этилтиобензимидазола фумарата в соответствии с заданным профилем высвобождения. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(5):533–540. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-763>

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26.07.2021 при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интереса.

Ilya D. Kasymov 
Alexei L. Marchenko 
Anna V. Basevich 

Developing Composition and Technology of Ethylthiobenzimidazole Fumarate Matrix Tablets According to Specified Release Profile

Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University,
14A Professor Popov Str., St. Petersburg 197376, Russian Federation

✉ Ilya D. Kasymov; kasymov.ilya@pharminnotech.com

ABSTRACT

INTRODUCTION. Ethylthiobenzimidazole fumarate (ETBIF) is a new actoprotector and adaptogenic active pharmaceutical ingredient (API). ETBIF was found to be effective given in short intervals; side effects related to ETBIF stomach solubility are well-known. Therefore, it is essential to develop a matrix dosage form with a specific release profile that can neutralise these side effects, prolong dosing intervals, and increase treatment compliance.

AIM. This study aimed to develop composition and production technology of ETBIF matrix tablets in accordance with a specified release profile (total release within 12 hours; not more than 50% of ETBIF released in acidic environment within the first two hours; the rest evenly released over the next 10 hours in the intestine-simulating environment).

MATERIALS AND METHODS. The study examined ETBIF (API) as well as hydroxypropylmethylcellulose (hypromellose) and ethyl cellulose-based matrix ETBIF tablets. Mechanical properties of the tablets were examined, in particular hardness and friability. ETBIF release profiles were studied in different phosphate buffer solutions (pH 1.2, 4.5, and 6.8) using a dissolution tester and UV spectrometry.

RESULTS. The authors studied ETBIF release kinetics from matrix systems with various matrix-forming components of different origin. Hypromellose-based compounds enabled prolonged ETBIF release (90% after 12 h). Ethyl cellulose compounds showed 60 to 90% release, with API mostly releasing in acidic environment. Adding an acid does not affect ETBIF release from matrix tablets.

CONCLUSIONS. A composition of matrix tablets has been developed that meets the specified release profile. Hypromellose-based tablets showed the most complete and uniform release of the substance in an environment simulating gastrointestinal tract. Adding an acid does not affect ETBIF release from matrix tablets, despite its increased solubility in the acidic environment.

Keywords: matrix tablets; matrix-forming components; ethylthiobenzimidazole fumarate; release profile; technology; composition; microcrystalline cellulose; MCC; hydroxypropylmethyl cellulose; hypromellose; ethyl cellulose; drug development; medicinal product

For citation: Kasymov I.D., Marchenko A.L., Basevich A.V. Developing composition and technology of ethylthiobenzimidazole fumarate matrix tablets according to specified release profile. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(5):533–540. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-763>

Funding. The study was carried out using the equipment of Analytical Center, Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, and funded under agreement No. 075-15-2021-685 as of 26 July 2021, with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Этилтиобензимидазола фумарат (ЭТБИФ) – активная фармацевтическая субстанция (АФС), относится к группе А13А «Общетонизирующие препараты и адаптогены» по АТХ-классификации. Повышает работоспособность и способствует ускоренному восстановлению организма после длительных экстремальных физических нагрузок, что актуально, в частности, для профессиональных спортсменов, спасателей, военных и других представителей физически тяжелых профессий. Ближайшим аналогом является этилтиобензимидазола гидробромид (Бемитил и Метапрот®), однако у субстанции ЭТБИФ более выражено антигипоксическое действие [1–4].

Отмечено, что наибольший терапевтический эффект достигается при курсовом приеме не менее двух раз в сутки [2–4], что снижает приверженность терапии. Для повышения приверженности интерес представляют пролонгированные лекарственные формы, позволяющие снизить частоту приема и повысить удобство применения. Ранее были изучены технологические аспекты микрокапсулирования субстанции ЭТБИФ в пролонгирующий полимер [5]. Другой пролонгированной формой являются матричные таблетки, преимуществом которых перед микрокапсулами является доступность и простота технологии.

В ходе предварительных исследований установлено, что АФС мало растворима в нейтральной водной среде, легко растворима в кислой среде (рН 1–2) и плохо в щелочной, причем растворимость линейно уменьшается с повышением рН. При этом отмечается, что при высокой концентрации ЭТБИФ в кислой среде желудка у пациента возникают болезненные ощущения в области живота [6]. Разработка лекарственного препарата с пролонгированным высвобождением позволит снизить дискомфорт у пациента при приеме таблетки за счет постепенного высвобождения субстанции в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и исключения создания локальной избыточной концентрации. При этом матричные таблетки как лекарственная форма не должны препятствовать полному растворению субстанции в нейтральной и щелочной средах.

Цель работы – разработка состава и технологии матричных таблеток этилтиобензимидазола фумарата в соответствии с заданным профилем высвобождения (полное высвобождение в течение 12 ч, не более 50% АФС высвобождается в кислой среде в течение первых 2 ч, оставшееся количество равномерно высвобождается

за последующие 10 ч в среде, моделирующей условия кишечника).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования является субстанция ЭТБИФ. В качестве матрицеобразующих компонентов использовали гидроксипропилметилцеллюлозу марки 60HD6 (вязкость 2% раствора 6 мПа·с) и марки 60HD15 (вязкость 2% раствора 15 мПа·с) – оба реагента производства Shandong Head, Китай, а также этилцеллюлозу Е7 (Colorcon, Великобритания). Выбор данных веществ позволяет сравнить разные по принципу действия типы замедляющей высвобождения матрицы. В качестве наполнителя были выбраны лактоза (DFE Pharma, Германия) и микрокристаллическая целлюлоза (JRS Pharma, Германия), поливинилпирролидон (Plasdone K-25, Ashland Inc., США) – связующее, стеарат кальция (Nitika, Индия) в качестве лубриканта. Также в состав таблеток вводили винную кислоту (х.ч., ООО «Вектон», Россия) как кислотный агент, предположительно локально повышающий растворимость ЭТБИФ. Сырье для получения таблеток предварительно было просеяно (размер отверстий сита 0,5 мм). Количества компонентов в составах представлены в *таблице 1*.

Массу для таблетирования в случае прямого прессования получали путем сухого смешивания. В случае влажной грануляции смесь увлажняли водой очищенной, протирали через сито с диаметром отверстий 3 мм, сушили в сушильном шкафу при температуре 60 °С не менее 30 мин до остаточной влажности 2%, протирали через сито с диаметром отверстий 1 мм, полученный гранулят опудривали кальция стеаратом. Прессование таблеток осуществляли на лабораторном таблетпрессе ПГР-10 (ООО «ЛабТулс», Россия), масса таблеток составила 400 мг, диаметр – 12 мм.

Для изучения профилей высвобождения был использован прибор для теста «Растворение» DT620 (ERWEKA, Германия) с лопастной мешалкой (100 об./мин), шприцевые фильтры (диаметр пор 0,22 мкм, материал PTFE), рН-метр FiveEasy F20-Standard (Mettler-Toledo, Швейцария), спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия). В качестве среды растворения были использованы фосфатные буферы с рН 1,2; 4,5 и 6,8, приготовленные в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации XV изд. (далее – ГФ РФ)¹. В тесте с имитацией условий ЖКТ изменение рН среды растворения с 1,2 на 6,8 осуществляли добавлением 10%

¹ ОФС.1.3.0003 Буферные растворы. Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. М.; 2023.

Таблица 1. Модельные составы матричных таблеток, содержащих этилтиобензимидазола фумарат

Table 1. Model compounds of matrix tablets containing ethylthiobenzimidazole fumarate

№ состава Compound No.	Компоненты Components									Прочностные показатели Strength indicators		
	Этилтиобензимидазола фумарат, мг Ethylthiobenzimidazole fumarate, mg	Этилцеллюлоза, мг Ethyl cellulose, mg	Гидроксипропилметилцеллюлоза (60HD6), мг Hydroxypropylmethylcellulose (60HD6), mg	Гидроксипропилметилцеллюлоза (60HD15), мг Hydroxypropylmethylcellulose (60HD15), mg	Винная кислота, мг Tartaric acid, mg	Стеарат кальция, мг Calcium Stearate, mg	Микрокристаллическая целлюлоза, мг Microcrystalline cellulose, mg	Лактоза, мг Lactose, mg	Поливинилпирролидон, мг Polyvinylpyrrolidone, mg	Итого, мг Total, mg	Истираемость, % Friability, %	Прочность на раздавливание, Н Hardness, N
Прямое прессование / Direct pressing												
1	200	–	80	–	28	4	48	40	–	400	0,19±0,05	99,8±6
2	200	–	140	–	28	4	16	12	–	400	0,18±0,06	90,9±7
3	200	–	140	–	–	4	32	24	–	400	0,14±0,05	109,3±8
4	200	80	–	–	28	4	60	–	28	400	0,08±0,05	130,4±7
5	200	140	–	–	28	4	–	–	28	400	0,05±0,04	124,9±4
6	200	140	–	–	–	4	28	–	28	400	0,07±0,04	160,6±7
7	200	–	–	80	–	4	108	–	8	400	0,12±0,05	102,3±4
8	200	–	–	120	–	4	68	–	8	400	0,21±0,04	95,6±5
9	200	–	–	160	–	4	28	–	8	400	0,16±0,03	90,8±6
10	200	40	–	–	–	4	148	–	8	400	0,09±0,04	100,5±6
11	200	80	–	–	–	4	108	–	8	400	0,07±0,03	104,6±7
12	200	120	–	–	–	4	68	–	8	400	0,11±0,04	112,7±4
Влажная грануляция / Wet granulation												
13	200	–	–	120	–	4	68	–	8	400	0,20±0,06	98,5±5
14	200	–	–	160	–	4	28	–	8	400	0,15±0,05	92,4±7
15	200	40	–	–	–	4	148	–	8	400	0,09±0,03	108,4±7
16	200	80	–	–	–	4	108	–	8	400	0,07±0,04	105,6±5

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «–» – отсутствует.

Note. –, not found.

раствора Na_2HPO_4 (х.ч., ЗАО «Вектон», Россия), необходимый объем которого (100 мл) был установлен заранее, увеличение объема среды учитывали при измерении концентраций. Для проведения теста использовали 3 стакана тестера растворения, каждый стакан наполняли 1000 мл буфера при температуре $37,0 \pm 0,1$ °C, в каждый стакан помещали одну таблетку с содержанием ЭТБИФ 200 мг. После начала теста отбирали

пробы объемом 5 мл с восполнением среды растворения в указанные в результатах промежуток времени и фильтровали их.

Отфильтрованные пробы в объеме 2,5 мл переносили в колбу на 50 мл, добавляли 1 мл спирта этилового 96%, добавляли 1 мл раствора 0,5 М NaOH (х.ч., ЗАО «Вектон», Россия), доводили раствор до метки водой очищенной, после чего

определяли содержание перешедшего в раствор ЭТБИФ методом УФ-спектрофотометрии при длине волны 289 ± 2 нм. Раствор стандарта готовили следующим образом. Точную навеску ЭТБИФ (100 мг) растворяли в 100 мл спирта этилового 96%, 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу на 100 мл, добавляли 0,5 мл раствора 2М NaOH и доводили водой очищенной до метки. Раствором сравнения был выбран раствор 0,01 М NaOH в воде очищенной. Описанная методика количественного определения ЭТБИФ основана на методике определения Метапрота (этилтиобензимидазола гидробромид) [7, 8], ее пригодность обоснована предварительной оценкой авторами по показателям «специфичность» и «линейность».

Статистическую обработку полученных результатов проводили в соответствии с ГФ РФ².

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в составах матричных таблеток гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) и этилцеллюлоза (ЭЦ) создают разный тип замедляющей матрицы: ГПМЦ образует гидрогелевый барьер на поверхности таблетки, а ЭЦ создает нерастворимый гидрофобный каркас [9–11]. Для сравнения влияния матрицеобразующих компонентов и их количеств на высвобождение ЭТБИФ были изготовлены и проанализированы 16 составов таблеток. Результаты контроля качества таблеток по показателям «кстираемость» и «прочность на раздавливание» представлены в *таблице 1*, все таблетки обладают удовлетворительными прочностными характеристиками.

Составы № 1–12 были получены методом прямого прессования, № 13–16 — методом влажного гранулирования. Лактозу вводили для повышения прочности и как порообразователь, поливинилпирролидон — для повышения прочности таблеток с ЭЦ, винная кислота введена в составы № 1, 2, 4, 5 для предполагаемого повышения растворимости субстанции ЭТБИФ и отсутствует в составах № 3 и 6 для сравнения. Чтобы не ограничивать высвобождение растворимостью субстанции и оценивать именно влияние матриц, средой растворения на первом этапе (составы № 1–6) был выбран фосфатный буфер с pH 4,5.

В случае таблеток, содержащих этилцеллюлозу, не удалось достичь высвобождения ЭТБИФ более 15% (*рис. 1а*), что может быть связано с избыточным количеством ЭЦ и гидрофобными

свойствами матрицы. Составы с ГПМЦ, наоборот, высвобождали более 60% АФС в течение первого часа, что говорит о недостаточной вязкости образующегося на поверхности таблетки гидрогелевого слоя. Таким образом, ни один состав не соответствует заданному профилю высвобождения. Также установлено, что, несмотря на зависимость растворимости субстанции ЭТБИФ от значения pH среды, наличие винной кислоты в составе таблеток в выбранном количестве не оказывает значимого влияния на скорость или степень высвобождения субстанции в выбранных количествах.

С учетом полученных результатов были сформированы составы № 7–12 (*табл. 1*). Была выбрана более вязкая ГПМЦ марки 60HD15, этилцеллюлоза добавлена в меньших количествах, а винная кислота и лактоза удалены из составов.

Введение ГПМЦ марки 60HD15 в количестве 30–40% замедляет высвобождение ЭТБИФ: с увеличением концентрации ГПМЦ снижается скорость высвобождения субстанции (*рис. 1б*). Аналогичная зависимость установлена и для ЭЦ в количестве 10–20%. Вероятно, с увеличением содержания МКЦ увеличивается количество пор в матрице таблетки, через которые среда растворения попадает внутрь и способствует растворению АФС.

Таблетки составов № 13–16 были получены путем влажной грануляции. Выбор влажной грануляции обоснован неудовлетворительными технологическими свойствами субстанции ЭТБИФ при ее высоком содержании, что не позволяет обеспечить однородность дозирования при сухом смешении в условиях производства. В качестве среды растворения были выбраны буферные растворы, моделирующие условия ЖКТ: первые 2 ч в среде с pH 1,2; последующие 10 ч — в среде 6,8.

Наиболее полно заданному профилю высвобождения соответствует состав № 13 (*рис. 2*). Из него высвобождается более 90% ЭТБИФ в течение 12 ч, при этом в первые 2 ч в среду растворения переходит не более 50% АФС. Состав № 14, несмотря на большее содержание матрицеобразующего компонента, высвобождает АФС уже через 8 ч. Такие результаты предположительно связаны с более высоким содержанием МКЦ в составе № 13 — данное вещество оказывает порообразующий эффект и проводит жидкость среды растворения вглубь таблетки. При большем количестве пор на поверхности

² ОФС.1.1.0013 Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний. Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. М.: 2023.

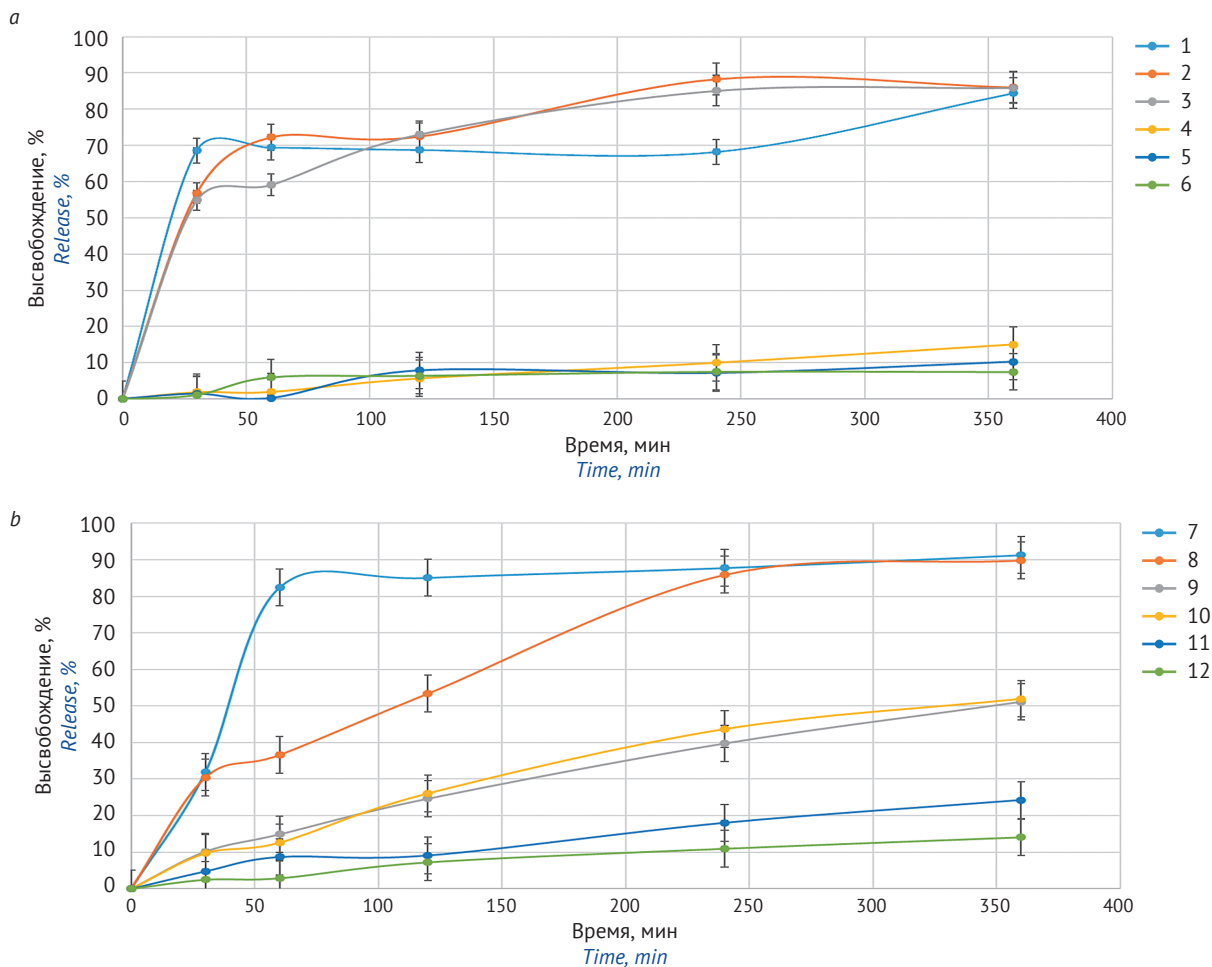


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / Figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Профили высвобождения этилтиобензимидазола фумарата в среде объемом 1000 мл с рН 4,5 из матричных таблеток составов: а – № 1–6; б – № 7–12

Fig. 1. Release profiles of ethylthiobenzimidazole fumarate from matrix tablets of compounds No. 1–6 in a 1,000 mL medium, with a pH of 4.5; No. 7–12 in a–b

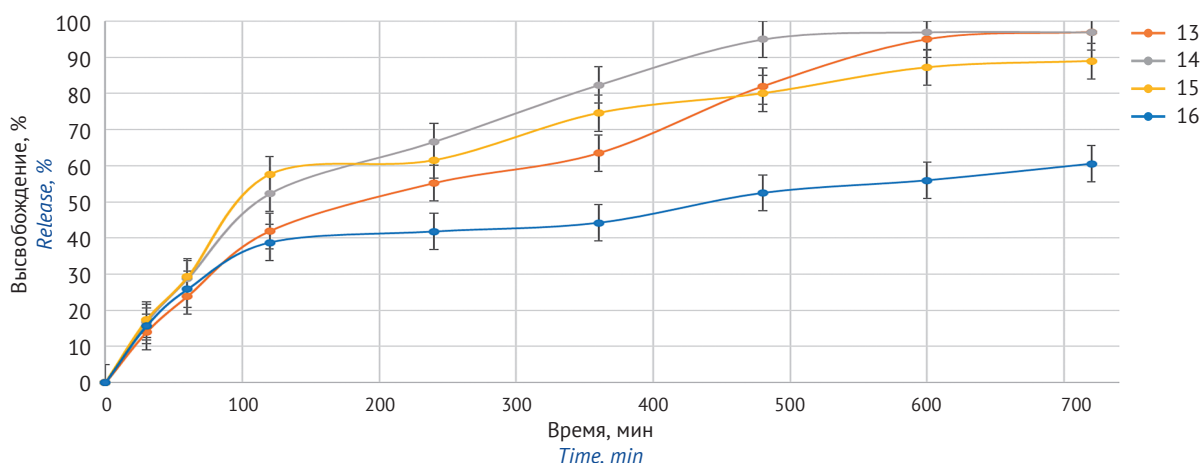


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Профили высвобождения этилтиобензимидазола фумарата из матричных таблеток составов № 13–16 в среде объемом 1000 мл, моделирующей условия желудочно-кишечного тракта

Fig. 2. Release profiles of ethylthiobenzimidazole fumarate from matrix tablets of compounds No. 13–16 in a 1,000 mL medium simulating gastrointestinal conditions

таблетки образуется более толстый гидрогелевый слой ГПМЦ за счет более глубокого проникновения среды растворения в таблетку, что и препятствует диффузии ЭТБИФ.

Из состава № 15 высвободилось около 90% ЭТБИФ за 12 ч. Однако в среде, моделирующей условия желудка, из этого состава высвобождалось ~60% субстанции, что не соответствует заданному профилю высвобождения. Увеличение содержания матрицеобразующего агента ЭЦ в составе № 16 приводит к значительному ухудшению растворения активной фармацевтической субстанции в среде, моделирующей условия кишечника.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы разработаны состав и технология матричных таблеток ЭТБИФ на основе ГПМЦ – состав № 13, обладающий необходимыми прочностными характеристиками и удовлетворяющий заданному профилю высвобождения (этилтиобензимидазола фумарат 200 мг, гидроксипропилметилцеллюлоза

(60HD15) 120 мг, стеарат кальция 4 мг, микрокристаллическая целлюлоза 68 мг, поливинилпирролидон 8 мг).

Изучено влияние матрицеобразователей с разными типами образования матрицы на высвобождение ЭТБИФ. Показано, что гидрогелевая матрица ГПМЦ обеспечивает более равномерное высвобождение АФС, растворимость которой зависит от pH среды растворения, чем гидрофобная матрица из ЭЦ.

Установлено, что, несмотря на лучшую растворимость ЭТБИФ в кислой среде, введение в состав кислотного агента в виде винной кислоты не оказывает значимого влияния на высвобождение ЭТБИФ из матричных таблеток.

Показано влияние МКЦ как порообразователя на кинетику высвобождения АФС. Таким образом, желаемый профиль высвобождения АФС из матричной таблетки может быть достигнут не только за счет матрицеобразующего агента, но и путем подбора порообразователя.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Оковитый СВ, Радько СВ, Дулепов АД, Юсковец ВН. Антигипоксическое и актопротекторное средство на основе 2-(этилсульфанил)-1Н-бензимидазол-3-ия (2Е)-3-карбоксыпроп-2-еноата. Патент Российской Федерации № 2673338; 2017. Okovityj SV, Radko SV, Dulepov AD, Yuskovets VN. Antihypoxic and act-protective agent based on 2-(ethylsulfanyl)-1h-Benzimidazol-3-y (2e)-3-carboxyprop-2-enoate. Patent of the Russian Federation № 2673338; 2017 (In Russ.). EDN: [LVGMNC](#)
- Болотина ЮД, Болотова ВЦ. Изучение антигипоксической активности нового производного бензимидазола с дикарбоновой кислотой в условиях гистотоксической гипоксии. *Биомедицина*. 2020;16(3):102–5. Bolotina YuD, Bolotova VTs. Study of the antihypoxic activity of a new benzimidazole derivative with dicarboxylic acid under histotoxic hypoxia. *Journal Biomed*. 2020;16(3):102–5 (In Russ.). <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-3-102-105>
- Болотова ВЦ, Болотина ЮД, Шустов ЕБ. Влияние этилтиобензимидазола фумарата на физическую работоспособность мышей в условиях одновременного гипоксического и гипертермического воздействия. *Биомедицина*. 2021;17(3E):139–43. Bolotova VTs, Bolotina YuD, Shustov EB. Effect of ethylthiobenzimidazole fumarate on the physical performance of mice under conditions of simultaneous hypoxic and hyperthermal exposure. *Journal Biomed*. 2021;17(3E):139–43 (In Russ.). <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-139-143>
- Дулепов АД, Радько СВ. Острая токсичность и влияние на физическую работоспособность нового производного этилтиобензимидазола при однократном и курсовом введении. В кн.: *Фундаментальная наука в современной медицине – 2018*. Сборник материалов сателлитной дистанционной научно-практической конференции студентов и молодых ученых. Минск; 2018. С. 109–13. Dulepov AD, Radko SV. Acute toxicity and effect on physical performance of a new derivative of ethylthiobenzimidazole with a single and course administration. *Fundamental science in modern medicine – 2018*. Collection of materials of the satellite remote scientific and practical conference of students and young scientists. Minsk; 2018. P. 109–13 (In Russ.).
- Касымов ИД, Марченко АЛ, Басевич АВ, Валева МЕ. Влияние параметров технологического процесса на микрокапсулирование субстанций с неудовлетворительными технологическими свойствами. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):146–54. Kasymov ID, Marchenko AL, Basevich AV, Valeeva ME. Influence of technological process parameters on microcapsulation of substances with unsatisfactory technological properties. *Drug Development & Registration*. 2023;12(4):146–54 (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1574>
- Лычиков АН, Питкевич ЭС, Мельник СН. Перспективы клинического применения антигипоксанта «Бемитил» (обзор литературы). *Проблемы здоровья и экологии*. 2011;(1):7–14. Lyzikov AN, Pitkevich ES, Melnik SN. Prospects for clinical application of antihypoxant “Bemithyl” (literature review). *Health and Ecology Issues*. 2011;(1):7–14 (In Russ.). <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2011-8-1-1>
- Вергейчик ТХ, Линникова ВА, Гуськова ГБ. Использование УФ-спектрофотометрии для выявления условий экстракции метапрота из водных растворов. *Фармация и фармакология*. 2014;2(5(6)):11–6. Vergeichik TH, Linnikova VA, Guskova GB. UV spectrophotometry application for identification of conditions for metaprote extraction from water solutions. *Pharmacy and Pharmacology*. 2014;2(5(6)):11–6 (In Russ.). [https://doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-5\(6\)-11-16](https://doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-5(6)-11-16)
- Вергейчик ТХ, Линникова ВА, Гуськова ГБ, Саркисян МС. Обнаружение и определение метапрота в печени и почках. *Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке*. 2017;19(8):210–4. Vergeichik TH, Linnikova VA, Guskova GB, Sargsyan MS. Detection and identification metaprote in the liver and kidneys. *Journal of Scientific Articles «Health & Education Millennium»*. 2017;19(8):210–4 (In Russ.). EDN: [YORPEJ](#)

9. Демина НБ. Современные тенденции развития технологии матричных лекарственных форм с модифицированным высвобождением (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2016;50(7):44–50. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2016-50-7-44-50>. Demina NB. Current trends in the development of technologies for matrix formulations with modified release (review). *Pharm Chem J*. 2016;50(7):475–80. <https://doi.org/10.1007/s11094-016-1472-4>
10. Анурова МН, Бахрушина ЕО, Демина НБ. Обзор современных гелеобразователей в технологии лекарственных форм. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(9):39–46. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2015-49-9-39-46>. Anurova MN, Bakhrushina EO, Demina NB. Review of contemporary gel-forming agents in the technology of dosage forms. *Pharm Chem J*. 2015;49(9):627–34. <https://doi.org/10.1007/s11094-015-1342-5>
11. Agarwal P, Semimul A. A comprehensive review on sustained release matrix tablets: a promising dosage form. *Univ J Pharm Res*. 2018;3(6):49–54. <https://doi.org/10.22270/ujpr.v3i6.222>
12. Nandhakumar S, Sugreevudu G, Harikrishnan N. Formulation design and evaluation of extended-release tablets of oxybutynin for effective management of overactive bladder syndrome. *Research J Pharm Tech*. 2021;14(12):6558–64. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2021.01135>
13. Алходри А, Сулина СН. Разработка гранул цефекоксиба для получения капсул и таблеток пролонгированного высвобождения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):68–73. Alkhodri A, Suslina SN. Development of celecoxib granules for manufacturing of prolonged release celecoxib capsules and tablets. *Drug Development & Registration*. 2022;11(1):68–73. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-68-73>
14. Коцур ЮМ, Флисюк ЕВ, Сидоров КО и др. Изучение влияния матрицеобразующих полимеров на скорость высвобождения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия из таблеток. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):91–5. Kotsur YuM, Flisyuk EV, Sidorov KO, et al. Study of the effect of matrix-forming polymers on the release rate of sodium 4,4'-(propanediamido) dibenzoate from tablets. *Drug Development & Registration*. 2023;12(4):91–5 (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1579>
15. Филиппова НИ, Вайнштейн ВА, Сон АВ, Минина СА. Регулирование высвобождения ибупрофена из матричных таблеток на основе карбопола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(1):58–64. Filippova NI, Vainshtein VA, Son AV, Minina SA. Regulation of ibuprofen release rate from matrix tablets. *Drug Development & Registration*. 2017;(1):58–64 (In Russ.). EDN: [YKPHCB](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2017-1-1-58-64)
16. Касымов ИД, Басевич АВ. Изучение технологических свойств вспомогательных веществ при разработке состава орально диспергируемых таблеток. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):46–53. Kasymov ID, Basevich AV. Study of the technological properties of excipients in the development of the composition of orally dispersible tablets. *Drug Development & Registration*. 2021;10(4):46–53 (In Russ.). [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-46-53](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-46-53)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: И.Д. Касымов – проведение экспериментов; И.Д. Касымов, А.Л. Марченко, А.В. Басевич – написание текста рукописи, обработка полученных данных.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Ilya D. Kasymov conducted experiments and processed the obtained data. Ilya D. Kasymov, Alexei L. Marchenko, Anna V. Basevich wrote the manuscript and discussed the results.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Касымов Илья Данисович / Ilya D. Kasymov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6954-3810>

Марченко Алексей Леонидович, канд. фарм. наук, доцент / **Alexei L. Marchenko**, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8049-6207>

Басевич Анна Викторовна, канд. фарм. наук, доцент / **Anna V. Basevich**, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6864-6794>

Поступила 23.04.2025

После доработки 21.05.2025

Принята к публикации 06.06.2025

Online first 06.08.2025




Received 23 April 2025

Revised 21 May 2025

Accepted 6 June 2025

Online first 6 August 2025



Р.И. Лукашов¹ 
Н.С. Гурина¹ 
М.Н. Пovyдыш² 

Технология получения настойки и экстракта золотарника канадского травы (*Solidago canadensis*)

¹ Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
пр-т Дзержинского, д. 83, г. Минск, 220083, Республика Беларусь

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
ул. Профессора Попова, д. 14, литера А, Санкт-Петербург, 197022,
Российская Федерация

✉ Лукашов Роман Игоревич; r_lukashov@mail.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Значимым направлением развития фармацевтической промышленности является переработка местного лекарственного растительного сырья. Одним из источников такого сырья может служить золотарник канадский (*Solidago canadensis* L.), обладающий противовоспалительными и диуретическими свойствами и произрастающий на территориях Российской Федерации и Беларуси. Предварительная обработка лекарственного растительного сырья повышает выход биологически активных веществ (в частности, флавоноидов) при экстракции, что целесообразно использовать при получении настойки и экстрактов золотарника канадского травы.

ЦЕЛЬ. Разработка технологии получения экстракционных лекарственных форм (настойка, экстракт) из золотарника канадского травы с использованием этапа предварительной обработки, позволяющего увеличить содержание флавоноидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Объект исследования – золотарника канадского трава. Изучали четыре способа предварительной обработки сырья: термообработка, обезжиривание и их комбинации в двух вариантах. Содержание флавоноидов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Содержание остаточных количеств органических растворителей – методом газовой хроматографии.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Наибольший выход флавоноидов в настойки наблюдали при объемной доле этанола – 60%, соотношении сырье (г) : экстрагент (мл) – 1:25, степени измельчения сырья – 2000 мкм, времени отстаивания первичной вытяжки – не более 4 сут при получении методом ремацерации. Наибольшее содержание флавоноидов в сухих экстрактах отмечено при относительном объеме отгонки 90%, температуре отгонки 80 °С, минимальном времени отгонки 40 мин, отгоняемом объеме 6 мл, времени отстаивания первичной вытяжки не более 4 сут. Наибольший выход флавоноидов в настойку наблюдался при термообработке золотарника канадского травы, в сухой экстракт – при предварительном обезжиривании лекарственного растительного сырья.

ВЫВОДЫ. Установлены оптимальные технологические параметры получения настоек и экстрактов золотарника канадского травы. Технологии получения настоек и сухих экстрактов, разработанные с учетом этапа предобработки, могут быть использованы для получения указанных экстракционных лекарственных форм золотарника канадского травы, обогащенных флавоноидами.

Ключевые слова: золотарника канадского трава; *Solidago canadensis*; флавоноиды; высокоэффективная жидкостная хроматография; ВЭЖХ; спектрофотометрия; предварительная обработка; обезжиривание; термическая обработка; настойки; экстракты; технология получения

Для цитирования: Лукашов Р.И., Гурина Н.С., Пovyдыш М.Н. Технология получения настойки и экстракта золотарника канадского травы (*Solidago canadensis*). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(5):541–549. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-5-541-549>

Финансирование. Работа выполнена в рамках задания 2.2.3 «Получить и стандартизировать экстракционные лекарственные формы с повышенным содержанием биологически активных веществ» в рамках государственной программы научных исследований 2 «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорхимия» подпрограммы 2.2 «Синтез и направленное модифицирование регуляторов биопроцессов (Биорегуляторы)».

Потенциальный конфликт интересов. Н.С. Гурина является членом редакционной коллегии журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» с 2024 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Raman I. Lukashou¹ 
Natalia S. Gurina¹ 
Maria N. Povydysh² 

Production Process of Canada Goldenrod Herb (*Solidago canadensis*) Tincture and Extract

¹ Belarusian State Medical University,
83 Dzerzhinsky Ave., Minsk 220083, Republic of Belarus

² Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University,
14A Prof. Popov St., St. Petersburg 197022, Russian Federation

✉ Raman I. Lukashou; r_lukashov@mail.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Pre-treatment of local herbal substances is an essential growth vector in pharmaceutical industry. Canada goldenrod (*Solidago canadensis* L.) is a promising source of anti-inflammatory and diuretic substance widespread in Russia and Belarus. Pre-treatment of herbal substances increases the yield of biologically active substances (in particular flavonoids) during extraction, a trait useful for obtaining tinctures and extracts of Canada goldenrod herbs.

AIM. This study aimed to develop processing technology of tinctures and extracts obtained from pre-treated Canada goldenrod allowing to increase the content of flavonoids.

MATERIALS AND METHODS. Canada goldenrod herb was the study object. Four pre-treatment options were studied: heat pre-treatment, defatting, and their combinations. The content of flavonoids was determined by high-performance liquid chromatography. Gas chromatography was used to define residual organic solvents.

RESULTS. The highest yield of flavonoids in tinctures was observed with ethanol volume fraction of 60–70%, raw materials to extractant ratio 1 g to 25 ml, grinding degree of raw materials 2,000 μm , and a settling time of the primary extract no more than four days for remaceration. The highest content of flavonoids in dry extracts is achieved with 90% relative distillation volume, 80 °C distillation temperature, 40 min minimum distillation time, 6 cm thickness of the distilled layer, and no more than 4 days settling time of the primary extract. The highest yield of flavonoids in the tincture is observed in heat pre-treatment of Canada goldenrod herb and in pre-treatment defatting of the herbal raw material for the dry extract.

CONCLUSIONS. Optimal technological parameters for production of Canada goldenrod herb tinctures and extracts have been established. The above technologies developed considering pre-treatment stage can be used to produce the specified extracts of Canada goldenrod herb enriched with flavonoids.

Keywords: Canada goldenrod herb; *Solidago canadensis*; flavonoids; high performance liquid chromatography; spectrophotometry; pre-treatment; defatting; heat pre-treatment; heat pre-treatment; defatting; tinctures; extracts; production technology

For citation: Lukashou R.I., Gurina N.S., Povydysh M.N. Production process of Canada goldenrod herb (*Solidago canadensis*) tincture and extract. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(5):541–549. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-5-541-549>

Funding. The work was carried out as part of Assignment 2.2.3 Production and Standardisation of Extracts with an Increased Content of Biologically Active Substances within the framework of State Research Programme No. 2 Chemical Processes, Reagents and Technologies, Bioregulators and Bioorganic Chemistry and Sub-programme No. 2.2 Synthesis and Targeted Modification of Bioprocess Regulators (Bioregulators).

Disclosure. Natalia S. Gurina has been a member of the Editorial Board of *Regulatory Research and Medicine Evaluation* since 2024. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из вопросов, стоящих перед фармацевтической промышленностью в связи с необходимостью импортозамещения, является поиск местных источников лекарственного растительного сырья (ЛРС). Трава золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.), сорного и инвазивного растения на территориях Республики Беларусь и Российской Федерации [1], может оказаться перспективным сырьем для разработки лекарственных растительных препаратов, содержащих флавоноиды и обладающих противовоспалительными и диуретическими свойствами [2–5].

Большую долю готовых лекарственных форм фитопрепаратов занимают настойки, сиропы, твердые лекарственные формы, которые получают из сухих экстрактов [6]. Одним из вариантов повышения эффективности использования ЛРС и выхода биологически активных веществ (БАВ) при получении экстракционных лекарственных форм (в том числе из сухих экстрактов) является предварительная обработка ЛРС термическим воздействием, обезжириванием и путем их комбинаций [7]. В связи с этим целесообразно разработать технологию получения экстракционных лекарственных форм (настоек, экстрактов), включающую предварительную обработку золотарника канадского травы.

Цель работы – разработка технологии получения экстракционных лекарственных форм (настойка, экстракт) из золотарника канадского травы (*Solidago canadensis* L.), включающей этап предварительной обработки, позволяющей увеличить содержание флавоноидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Объектом исследования являлась золотарника канадского трава, заготовленная от дикорастущих форм в фазу массового цветения в августе–сентябре 2018–2022 гг. в местах естественного произрастания в Беларуси в окрестностях д. Новое

поле (Минский р-н), д. Ольгово (Витебский р-н), д. Заречье (Бобруйский р-н) и высушенная воздушно-теневым способом (потеря в массе при сушивании не превышала 8–10%).

Методы

Настойки. Настойки получали методами мацерации; бис- и ремацерации; мацерации и последующей ультразвуковой экстракции; мацерации и последующим механическим перемешиванием.

При получении настоек методом мацерации изучали влияние на выход флавоноидов: объемной доли этанола (50, 60 и 70%) [8]; длительности настаивания (1–14 сут); соотношения сырье (г) : водный раствор этанола (мл) (1:5, 1:10, 1:25, 1:50 и 1:100); степени измельчения сырья (размер частиц сырья, который проходит сквозь ячейки сита соответствующего размера: 2000, 1000 и 500 мкм); длительности отстаивания первичной вытяжки (1–14 сут). Настойку фильтровали через фильтр «белая лента», отжимали сырье, вытяжку оставляли при температуре не выше 10 °С и после отстаивания фильтровали в емкость из темного стекла.

Интенсификация мацерации: комбинирование мацерации с последующим воздействием ультразвука в течение 45 мин (ультразвуковая экстракция) в экстракторе модели НО-455.00 ПС (ООО «Александра-плюс»); комбинирование мацерации с последующим механическим перемешиванием в течение 60 мин; бисмацерация и ремацерация.

Сухие экстракты. В процессе получения густого экстракта изучали влияние на содержание флавоноидов относительного объема отгонки экстрагента (90, 75, 67 и 50%). Отгонку экстрагента проводили до получения мягкого продукта (содержание влаги не более 25%).

Сухие экстракты получали при минимальном¹ и заданном времени полной отгонки экстрагента при температурах 40–180 °С с шагом 20 °С. Отгонку экстрагента проводили

¹ Минимальное время – наименьшая продолжительность процесса (ч), при которой образуется сухой экстракт при заданной температуре отгонки экстрагента.

из выпарительной чаши до потери в массе при высушивании не более 5%. Определяли зависимость содержания флавоноидов в экстракте от объема отгоняемой первичной вытяжки (2, 6, 10 и 13 мл). Также изучали влияние продолжительности отстаивания первичной вытяжки (1–4 сут) на содержание БАВ в жидкой фазе.

Предобработка сырья. Настойки и сухие экстракты получали из ЛРС, обработанного путем обезжиривания (обезжиривающий агент – толуол; продолжительность – 1 ч; соотношение сырье (г) : агент (мл) – 1:5; кратность – однократное), термической обработки (температура в упаковке – 120 °С; продолжительность – 1 ч; толщина слоя обрабатываемого порошка сырья – 2–3 см) и комбинации в двух вариантах обезжиривания и термической обработки:

1) обезжиривание золотарника канадского травы, затем, после естественного улетучивания агента, термическая обработка сырья в упаковке (фольге);

2) термическая обработка золотарника канадского травы в упаковке (фольге), затем обезжиривание с последующим естественным улетучиванием обезжиривающего агента.

Предварительную обработку проводили согласно условиям, подобранным ранее [9, 10]. Количественное определение флавоноидов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [11]. Содержание остаточных количеств обезжиривателя и экстрагента определяли методом газовой хроматографии [7].

Статистическую обработку результатов проводили при помощи компьютерной программы Microsoft Office Excel 2016 (пакет «Анализ данных»). Каждое испытание выполняли три раза ($n=3$; $P=0,95$). Результаты представляли в виде $\bar{X} \pm \Delta_{\bar{X}}$, где \bar{X} – среднее значение; $\Delta_{\bar{X}}$ – полуширина доверительного интервала среднего значения. Сравнение двух групп значений проводили при помощи t -критерия Стьюдента. Значения статистически значимо различались при p -value $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При экстракции 50, 60 и 70% этанолом содержание флавоноидов составило $4,92 \pm 0,12$; $5,80 \pm 0,15$ и $6,00 \pm 0,18\%$ соответственно, т.е. при получении настоек методом мацерации наибольшее содержание флавоноидов золотарника канадского травы отмечено при экстракции 70% этанолом. Однако различия между экстракцией 70 и 60% этанолом не были статистически значимыми ($p=0,15$), поэтому с целью экономии материальных ресурсов для получения настойки

золотарника можно рекомендовать использовать 60% этанол.

В течение 6, 3 и 1 сут ($p = 0,28, 0,56$ и $0,10$) настаивания содержание флавоноидов оставалось практически одинаковым (рис. 1). В течение первых 2 сут ($p=0,0031$) и с 4 по 7 сут ($p=0,0040$) наблюдали статистически значимые колебания содержания, что предположительно связано с распределением БАВ в объеме экстрагента в течение 2 сут мацерации и последующим (спустя 3 сут) установлением равновесия между агликонами и гликозидами флавоноидов ввиду их первичного гидролиза в жидкой среде. В связи с этим выбрана продолжительность мацерации 3 сут.

При соотношении сырье (г) : экстрагент (мл) 1:10 содержание флавоноидов золотарника канадского травы на 38,7% (отн.) больше ($p=0,0063$), чем при 1:5, и значимо не отличалось ($p=0,096$) – 8,9% (отн.) от такового при соотношении 1:25 (рис. 1). С учетом выхода объема (при соотношении 1:10 из 10 г сырья получали 100 мл настойки, 1:25 – 250 мл, что в 2,5 раза больше) настойки целесообразно использовать соотношение 1:25.

Содержание флавоноидов при получении настоек из ЛРС со степенью измельчения 500, 1000 и 2000 мкм составило $2,92 \pm 0,10$; $3,04 \pm 0,25$ и $3,78 \pm 0,13\%$ соответственно, т.е. при степени измельчения 2000 мкм содержание на 24,3% (отн.) значимо больше ($p=0,014$) по сравнению с 1000 мкм.

Содержание флавоноидов в исходной вытяжке составило $5,79 \pm 0,59\%$, после 1 сут отстаивания – $5,05 \pm 0,67\%$, что, по сравнению с исходным, статистически незначимо меньше на 14,6% (отн.) ($p=0,084$). При отстаивании в течение 1–4 сут содержание флавоноидов золотарника незначимо ($p=0,35$) уменьшалось с $5,21 \pm 0,90$ до $5,01 \pm 0,74\%$.

Содержание флавоноидов при получении настоек методом мацерации с последующей ультразвуковой экстракцией, мацерации с последующим механическим перемешиванием, бис- и ремацерации составило $1,89 \pm 0,11$, $2,01 \pm 0,15$, $6,54 \pm 0,33$ и $13,1 \pm 0,9\%$ соответственно. При получении настоек из обработанного ультразвуком сырья содержание флавоноидов составило $3,62 \pm 0,14\%$, что в 1,9 раза больше, чем при комбинировании мацерации с последующей ультразвуковой экстракцией. Максимального содержания флавоноидов удается достичь при получении настойки золотарника методом ремацерации (в 2 раза ($p=2,8 \times 10^{-4}$) больше, чем при бисмацерации).

При проведении дисперсионного анализа установлено, что продолжительность мацерации ($p=2,8 \times 10^{-4}$), соотношение сырье (г) : экстрагент (мл)

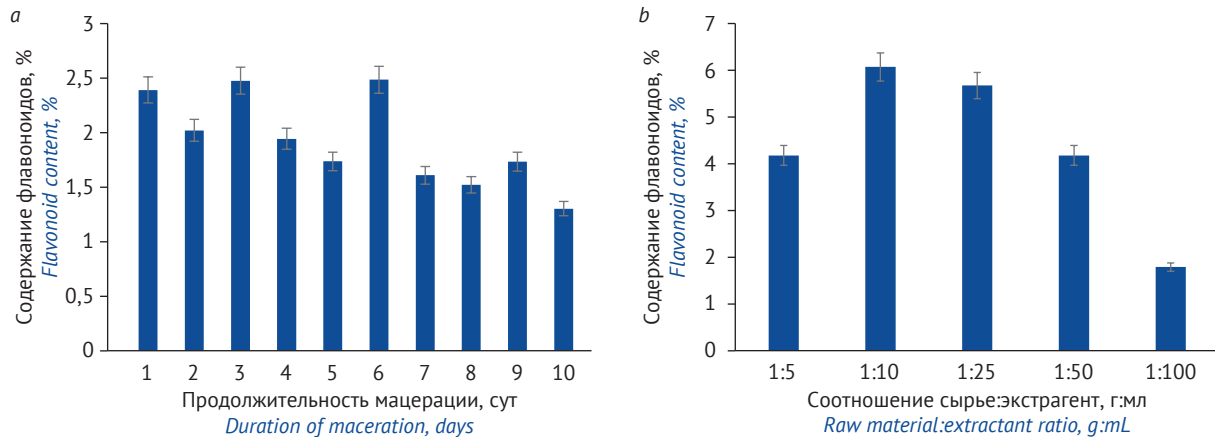


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Зависимость содержания флавоноидов в настойках золотарника канадского травы от: а – продолжительности мацерации; б – соотношения сырья : экстрагент

Fig. 1. Correlation between flavonoid content in goldenrod tinctures and a, maceration days raw; b, materials : extractant ratio

($p=5,6 \times 10^{-4}$), степень измельчения сырья ($p=2,8 \times 10^{-3}$) и способ получения ($p=1,8 \times 10^{-6}$) статистически значимо ($p < 0,05$) влияли, а продолжительность отстаивания ($p=0,52$) статистически значимо не влияла на содержание флавоноидов в настойке золотарника.

Настойки, полученные из ЛРС, предобработанного любым апробированным способом, содержали больше флавоноидов (от 39,0% (отн.) ($p=3,4 \times 10^{-4}$; $4,48 \pm 0,39\%$) до 112% (отн.) ($p=3,4 \times 10^{-7}$; $6,32 \pm 0,32\%$)) по сравнению с настойками, полученными из нативного сырья ($2,92 \pm 0,38\%$). Наибольший выход в настойку золотарника флавоноидов наблюдали при термической обработке сырья ($6,32 \pm 0,59\%$).

Таким образом, можно предложить следующую технологию получения настойки золотарника канадского травы (рис. 2). Рассчитанный объем 60% этанола (с учетом коэффициента спиртопоглощения) при соотношении сырье (г) : экстрагент (мл) 1:25 делят на три равные части. Сырье после предварительной термообработки [9] также разделяют на 3 равные части. Первую часть золотарника канадского травы, измельченной до частиц размера 2000 мкм (сырье № 1), заливают первой порцией 60% этанола (этанол № 1) и оставляют для настаивания на 3 сут. Извлечение сливают (вытяжка № 1), сырье отжимают (шрот № 1), заливают второй порцией 60% этанола (этанол № 2) и настаивают в течение 3 сут. Вытяжку после первого настаивания (вытяжку № 1) прибавляют ко второй части сырья (сырье № 2), настаивают 3 сут. После этого вытяжку сливают (вытяжка № 2) и прибавляют к третьей части сырья (сырье № 3), настаивают 3 сут. Сырье (шрот № 2) после настаивания

отжимают, к нему прибавляют вытяжку, слитую с первой части сырья (вытяжка № 1). К первой части сырья (сырье № 1) прибавляют третью порцию 60% этанола (этанол № 3), настаивают 3 сут. Так последовательно повторяют до того момента, пока не получают последнюю вытяжку из третьей части сырья (вытяжка № 3). Все полученные в ходе ремацерации вытяжки объединяют, фильтруют, объединенную вытяжку оставляют для отстаивания при температуре не выше 10 °C не более 4 сут, после чего фильтруют.

Содержание флавоноидов при отгонке 90, 75 и 67% экстрагента от первоначального объема составило $22,9 \pm 0,8$; $16,3 \pm 1,3$ и $14,5 \pm 2,0\%$; при этом содержание при отгонке 90% статистически значимо больше на 40,5% (отн.) ($p=0,0023$) и 57,9% (отн.) ($p=0,0015$), чем при отгонке 75 и 67% соответственно.

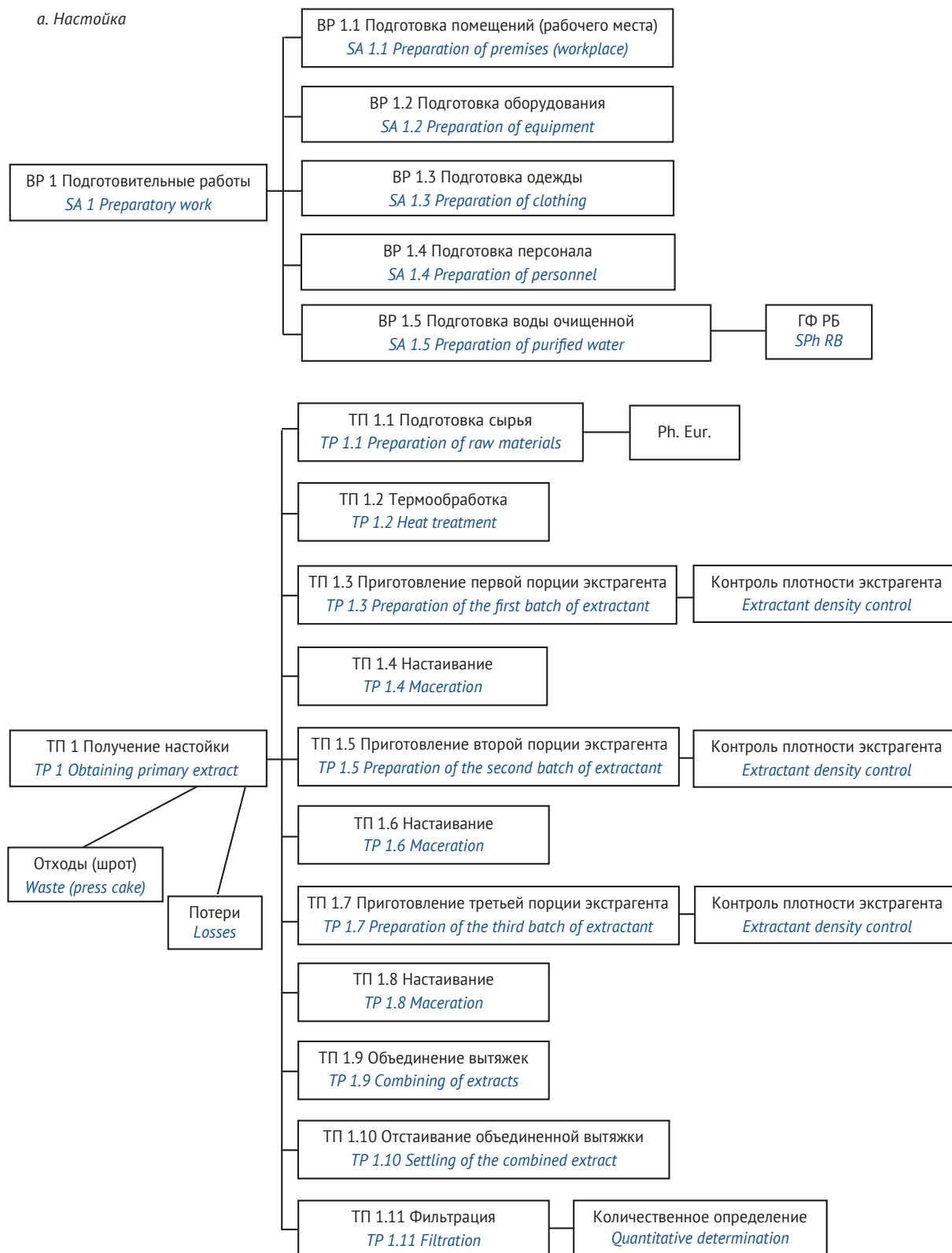
При отгонке экстрагента за минимальное время (5 мин – 2 ч в зависимости от температуры) содержание флавоноидов золотарника максимально при 100 и 120 °C ($p=0,26$); при 100 °C на 8,4% (отн.) и 9,0% (отн.) больше ($p=0,073$ и $0,080$), чем при 80 и 60 °C соответственно (рис. 3). При этом время отгонки при 100 и 80 °C отличается незначительно (на 11,2% (отн.), $p=0,083$) в отличие от 60 °C (разница в два раза), поэтому в дальнейшем для экономии энерго- и временных ресурсов можно рекомендовать температуру отгонки 80 °C.

При заданном промежутке времени в 1,5 ч (показатель «потеря в массе при высушивании» при всех изученных температурах составлял менее 5%) содержание флавоноидов максимально при 80 °C, что на 6,4% (отн.) и 8,7% (отн.) больше ($p=0,14$ и $0,15$ соответственно), чем при 60 °C и 40 °C (рис. 3). При минимальном времени отгонки содержание

флавоноидов в целом выше, чем при заданном времени ($F_{крит} = 4,61$; $F = 120$; $p = 1,34 \times 10^{-8}$).

При отгонке экстрагента из 6 мл ($23,4 \pm 1,2\%$) первичной вытяжки содержание флавоноидов золотарника в два раза больше по сравнению

с отгонкой из остальных изученных объемов (от $9,21 \pm 0,28\%$ до $10,2 \pm 0,7\%$). При отстаивании первичной вытяжки в течение 1–4 сут наблюдали незначительное снижение содержания (с $9,50 \pm 0,38$ до $9,12 \pm 0,29\%$; $p = 0,15$). Температура отгонки



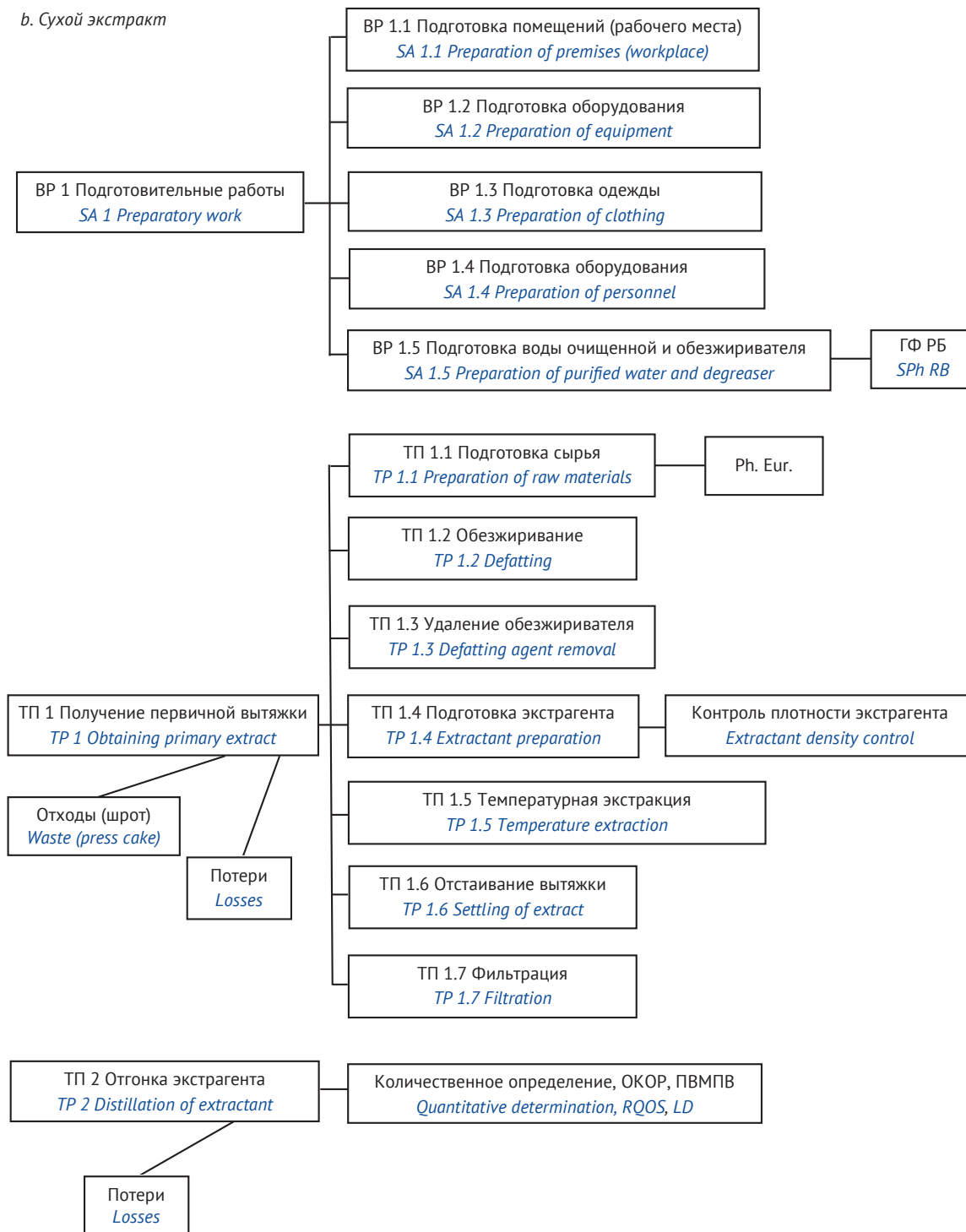


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 2. Технологическая схема получения настойки и сухого экстракта золотарника канадского травы: а – настойка; в – сухой экстракт; Ph. Eur. – Европейская фармакопея; ГФ РБ – Государственная фармакопея Республики Беларусь; ВР – подготовительные работы; ТП – технологический процесс; ОКОР – остаточные количества органических растворителей; ПВМПВ – потеря в массе при высушивании

Fig. 2. Process flowchart for production of tincture and dry extract of Canada goldenrod herb: a, tincture; b, dry extract; Ph. Eur., European Pharmacopoeia; SPh RB, State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus; PW, preparatory work; TP, technological process; ROS, residual organic solvents; LoD, loss on drying

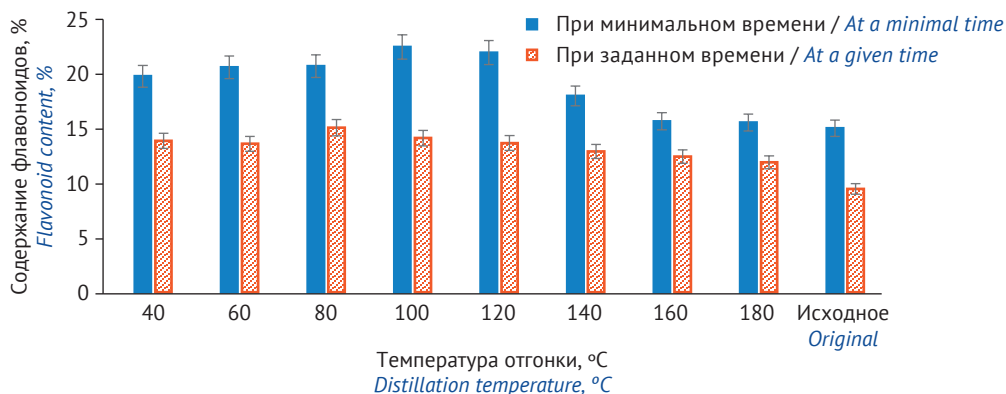


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Зависимость содержания флавоноидов в сухих экстрактах золотарника от температуры отгонки экстрагента при минимальном и заданном времени

Fig. 3. Correlation between flavonoid content in dry goldenrod extracts and distillation temperature of the extractant for a minimum time and a given time

при минимальном от 5 мин (при 140–180 °C) до 2 ч (при 40 °C) ($p=2,7 \times 10^{-4}$) и заданном в 1,5 ч времени ($p=1,5 \times 10^{-4}$), толщина отгоняемого слоя ($p=2,1 \times 10^{-5}$) статистически значимо ($p < 0,05$) влияли, а продолжительность отстаивания вытяжки ($p=0,49$) значимо ($p > 0,05$) не влияла на содержание флавоноидов сухого экстракта золотарника.

Сухие экстракты золотарника, полученные при всех изученных способах предобработки сырья, содержали значимо больше флавоноидов (от 25,3% (отн.) ($p=0,020$; $17,1 \pm 1,0\%$) до 95,2% (отн.) ($p=0,00074$; $28,2 \pm 2,1\%$)) с максимумом при обезжиривании сырья ($28,2 \pm 2,1\%$), что на 6,8% (отн.) больше ($p=0,095$), чем при термической обработке ($26,4 \pm 0,9\%$).

Для удаления жирного масла из конечного продукта на разных стадиях его технологического процесса проводили обезжиривание. Обезжиривание первичной вытяжки ($14,0 \pm 1,0\%$), густого ($19,6 \pm 1,5\%$) и сухого ($19,0 \pm 1,2\%$) экстрактов приводило к снижению содержания флавоноидов золотарника в 1,5–2 раза по сравнению с обезжириванием самого ЛРС.

Содержание остаточных количеств толуола и этанола в сухом экстракте золотарника составило 0,0096% (фармакопейная норма – не более 0,089%²) и 0,0054% (предел 0,5%) соответственно.

Таким образом, может быть предложена следующая технология получения сухого экстракта золотарника канадского травы (рис. 2). Первичную вытяжку фильтруют, отжимают сырье, оставляют вытяжку для отстаивания при температуре не выше 10 °C в течение не более 4 сут, после чего фильтруют. Фильтрат в объеме около 6 мл

помещают в выпарительную чашу и проводят отгонку экстрагента при 80 °C в течение не более 40 мин. При этом сухой экстракт, полученный после обезжиривания, растворяется в эквивалентном объеме экстрагента полностью, в отличие от сухого экстракта, полученного из ЛРС, не подвергнутого обезжириванию.

При получении сухого экстракта по методике авторов [2] содержание флавоноидов более чем в 5 раз меньше, чем при разработанном способе с предварительным обезжириванием сырья.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определены условия получения настоек и экстрактов, позволяющие повысить эффективность экстракции флавоноидов из золотарника канадского травы (*Solidago canadensis herba*). В случае получения настоек: объемная доля этанола – 60%; соотношение сырье (г) : экстрагент (мл) – 1:25; метод получения – ремацерация; степень измельчения сырья – 2000 мкм; время отстаивания первичной вытяжки – не более 4 сут; способ предварительной обработки – термообработка. В случае получения экстрактов: относительный объем отгонки – 90%; температура отгонки – 80 °C; минимальное время отгонки – в течение 40 мин; отгоняемый объем – 6 мл; время отстаивания первичной вытяжки – не более 4 сут; способ предобработки – обезжиривание исходного ЛРС.

Разработанная технология экстракционных лекарственных форм золотарника канадского травы с повышенным содержанием флавоноидов может быть предложена для масштабирования и трансфера в фармацевтическое производство.

² Фармакопейная статья 01/2013:РБ50400. Остаточные количества органических растворителей. Государственная фармакопея Республики Беларусь. 2-е изд. Т. 1. Молодечно; 2012.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Прохоров ВН, Ламан НА. Золотарник канадский (*Solidago canadensis* L.): биологические особенности, хозяйственное использование и меры ограничения распространения. *Ботаника (исследования)*. 2018;(47):150–68. Prokhorov VN, Laman NA. Canadian goldenrod (*Solidago canadensis* L.): biological characteristics, economic use and measures to limit its spread. *Botany (Research)*. 2018;(47):150–68 (In Russ.). EDN: [TCFNCV](#)
2. Савченко ЛН, Маринина ТФ, Карпенко ВА. Получение экстракционного препарата противовоспалительно-го и мочегонного действия из травы золотарника канадского. *Известия Самарского научного центра РАН*. 2016;18(2):195–8. Savchenko LN, Marinina TF, Karpenko VA. Receiving the extraction preparation with anti-inflammatory and diuretic affects from *Solidago canadensis* herbs. *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2016;18(2):195–8 (In Russ.). EDN: [WKPIXB](#)
3. Сулейманова ФШ, Нестерова ОВ, Матюшин АА. Изучение технологических параметров и числовых показателей качества сырья травы золотарника канадского (*S. canadensis* L.). *Сеченовский вестник*. 2018;(3):64–8. Suleymanova FSh, Nesterova OV, Matyushin AA. Study of technological parameters and the numerical indicators of the quality of crude materials of Canadian goldenrod herb (*Solidago canadensis* L.). *Sechenov Medical Journal*. 2018;(3):64–8 (In Russ.). EDN: [YPVIKT](#)
4. Тохтабаева ГМ, Баслинов СЛ, Копылова ИЕ и др. Усовершенствование методики количественного определения суммы флавоноидов в траве золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.). *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2013;(10):4–8. Tokhtabaeva GM, Baslinov SL, Kopylova IE, et al. The modified quantitative method of flavonoid determination in aerial part of *Solidago canadensis* L. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2013;(10):4–8 (In Russ.). EDN: [RKVXUX](#)
5. Сулоев ИС, Понкратова АО, Дудецкая НА, и др. Стандартизация травы золотарника канадского. *Фармация*. 2020;69(8):13–20. Suloev IS, Ponkratova AO, Dudetskaya NA, et al. Standardization of Canadian goldenrod herb. *Pharmacy*. 2020;69(8):13–20 (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-08-02>
6. Курс ИЛ. Анализ ассортимента лекарственных средств растительного происхождения, зарегистрированных в Республике Беларусь. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2023;22(4):105–21. Kurs IL. Analysis of the assortment of herbal medicines registered in the Republic of Belarus. *Vitebsk Medical Journal*. 2023;22(4):105–21 (In Russ.). <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2023.4.105>
7. Лукашов РИ, Гурина НС. Влияние обезжиривания эхинацеи пурпурной травы на экстракцию гидроксикоричных кислот. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(2):207–16. Lukashou RI, Gurina NS. Effect of *Echinacea purpurea* herb defatting on the extraction of hydroxycinnamic acids. *Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medical Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(2):207–16 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-2-207-216>
8. Лукашов РИ. Влияние природы и концентрации экстрагентов на извлечение флавоноидов из травы золотарника канадского. *Химия растительного сырья*. 2018;(4):113–23. Lukashou RI. Influence of the nature and concentration of extractants on the extraction of flavonoids from the Canadian goldenrod grass. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2018;(4):113–23 (In Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018043863>
9. Лукашов РИ, Гурина НС. Влияние параметров термической обработки травы золотарника канадского на экстракцию флавоноидов. В кн.: *БГМУ в авангарде медицинской науки и практики*. Минск; 2019. С. 357–62. Lukashou RI, Gurina NS. Thermal processing of Canadian goldenrod herb. In: *BSMU at the Forefront of Medical Science and Practice*. Minsk; 2019. P. 357–62 (In Russ.). EDN: [VEULSH](#)
10. Лукашов РИ, Гурина НС. Предварительное обезжиривание травы золотарника канадского. В кн.: *Современные достижения фармацевтической науки и практики*. Витебск; 2019. С. 98–102. Lukashou RI, Gurina NS. Preliminary defatting of Canadian gold herbs. In: *Modern Achievements of Pharmaceutical Science and Practice*. Vitebsk; 2019. P. 98–102 (In Russ.). EDN: [VZRYIH](#)
11. Лукашов РИ. Факторы, влияющие на водно-спиртовую экстракцию флавоноидов из травы золотарника канадского. *Рецепт*. 2018;21(1):10–25. Lukashou RI. Factors with influence on the hydroalcoholic extraction of flavonoids from Canadian goldenrod herb. *Recipe*. 2018;21(1):10–25 (In Russ.). EDN: [YQLJBK](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Р.И. Лукашов – выполнение эксперимента, проведение статистической обработки и оформление результатов; Н.С. Гурина – разработка дизайна эксперимента; М.Н. Пovyдыш – участие в обработке, обсуждении результатов и формулировании выводов.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Raman I. Lukashou performed the experiment, carried out statistical processing and presented the results. Natalia S. Gurina developed the design of the experiment. Maria N. Povydysh participated in the processing, discussion of results and formulation of conclusions.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Роман Игоревич Лукашов, канд. фарм. наук, доцент / **Raman I. Lukashou**, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5234-6319>

Наталья Сергеевна Гурина, д-р биол. наук, профессор / **Natalia S. Gurina**, Dr. Sci. (Biol.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-9150-5728>

Мария Николаевна Пovyдыш, д-р биол. наук, доцент / **Maria N. Povydysh**, Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7768-9059>

Поступила 22.07.2025

После доработки 08.09.2025






Принята к публикации 15.10.2025

Received 22 July 2025

Revised 8 September 2025

Accepted 15 October 2025



В.М. Косман 
М.В. Карлина 
Н.М. Фаустова 
М.Н. Макарова 
В.Г. Макаров 

Вопросы валидации биоаналитических методик количественного определения биомаркеров: обзор нормативных документов

Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ»,
Заводская ул., д. 3, к. 245, г.п. Кузьмоловский, Всеволожский р-н,
Ленинградская обл., 188663, Российская Федерация

✉ Косман Вера Михайловна; kosman.vm@doclinika.ru, info@doclinika.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Биомаркеры используют при оценке нормальных физиологических процессов в организме; для диагностики и подбора терапии различных заболеваний; при разработке новых лекарственных препаратов. Расширение использования биомаркеров в качестве инструментов разработки лекарственных препаратов обуславливает необходимость совершенствования методов их количественного определения.

ЦЕЛЬ. Обобщение материалов по вопросам валидации биоаналитических методик количественного определения биомаркеров.

ОБСУЖДЕНИЕ. Использованы регуляторные документы Международного совета по гармонизации (International Council for Harmonisation, ICH), Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA), включая Рабочую группу по совместному обсуждению анализа биомаркеров (Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group) и Институт критического пути (Critical Path Institute, C-Path) Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA), Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) и научные публикации, находящиеся в открытом доступе (в том числе по данным библиографических баз и поисковых систем PubMed, Web of Science, РИНЦ (eLIBRARY.RU), Google Scholar), преимущественно опубликованные в период 2014–2024 гг. Рассмотрены процессы аналитической и клинической валидации биомаркеров, отмечены этапы их аналитической валидации, выделены ключевые показатели валидации биоаналитической методики в зависимости от задачи (анализ для исследований фармакокинетики, биоэквивалентности и токсикокинетики; анализ биомаркеров при разработке лекарственных препаратов и для диагностики в ходе доклинических и клинических исследований). Предложен алгоритм выбора уровня аналитической валидации биомаркеров в зависимости от особенностей метода (хроматография, лигандсвязывающие методы с использованием наборов реагентов различного назначения) и решаемых задач.






ВЫВОДЫ. Подтверждение пригодности методики анализа биомаркеров для применения согласно планируемым целям близко к общепринятой процедуре валидации биоаналитических методик. Необходимо широкое научное обсуждение деталей валидации анализа биомаркеров, поскольку выработка единого алгоритма этой сложной процедуры будет способствовать более надежному использованию биомаркеров, повышению качества сопутствующих этому процессу исследований и конечному результату – введению в обращение новых эффективных и безопасных лекарственных препаратов.

Ключевые слова: биомаркеры; биоаналитическая методика; биоматериал; аналитическая валидация; клиническая валидация; валидационные параметры; объем валидационных испытаний; доклинические исследования; клинические исследования

Для цитирования: Косман В.М., Карлина М.В., Фаустова Н.М., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Вопросы валидации биоаналитических методик количественного определения биомаркеров: обзор нормативных документов. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(5):550–564. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-766>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. М.Н. Макарова – член редакционной коллегии журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» с 2018 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Vera M. Kosman ✉ 
Marina V. Karlina 
Natalya M. Faustova 
Marina N. Makarova 
Valery G. Makarov 

Validating Bioanalytical Methods for Biomarker Quantitation: A Regulatory Document Review

Research-and-manufacturing company “HOME OF PHARMACY”,
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement,
Vsevolozhsky district, Leningrad region 188663, Russian Federation

✉ Vera M. Kosman; kosman.vm@doclinika.ru, info@doclinika.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Biomarkers are used to assess normal physiological processes in the body; to diagnose and select therapy for various diseases; and to develop new drugs. The increasing use of biomarkers as drug development tools necessitates improvements in analytical quantification methods.

AIM. This study aimed to review and summarise data on validation of bioanalytical methods for biomarker quantification.

DISCUSSION. The analysed regulatory documents were issued by International Council for Harmonisation (ICH), as well as Food and Drug Administration (FDA), including the Biomarker Assay Collaborative Evidential Considerations Writing Group and Critical Path Institute (C-Path); European Medical Agency (EMA); Eurasian Economic Commission (EEC); and other publicly available research platforms (including PubMed, Web of Science, RSCI (eLIBRARY.RU), and Google Scholar online databases) primarily published in 2014–2024. Analytical and clinical biomarker validation was examined, alongside with analytical validation stages and key validation parameters of the bioanalytical method depending on the objective (analysis for pharmacokinetics, bioequivalence, and toxicokinetics studies; biomarker analysis in drug development and for diagnosis in preclinical and clinical studies). Proposed is an algorithm for choosing biomarker analytical validation level depending on the method (chromatography, ligand-binding methods using reagent kits for various purposes) and the issues to be addressed.

CONCLUSIONS. Confirming biomarker method suitability as per the objectives is similar to a common validation procedure of bioanalytical methods. A broad and detailed scientific discussion of biomarker analysis validation is needed, since a comprehensive scheme developed for this complex procedure will contribute to more reliable use of biomarkers, improved quality of studies within this process, and resulting safe and effective new medicinal products.

Keywords: biomarkers; bioanalytical method; biomaterial; analytical validation; clinical validation; validation parameters; scope of validation tests; pre-clinical study; clinical study

For citation: Kosman V.M., Karlina M.V., Faustova N.M., Makarova M.N., Makarov V.G. Validating bioanalytical methods for biomarker quantitation: A regulatory document review. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(5):550–564. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-766>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. Marina N. Makarova has been a member of the Editorial Board of *Regulatory Research and Medicine Evaluation* since 2018. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно определению, данному Рабочей группой по определениям биомаркеров (Biomarkers Definitions Working Group) Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA, США) и Национального института здоровья (National Institutes of Health, NIH), «биологические маркеры – это количественно определяемые биологические параметры, которые как индикаторы определяют норму, патологию и результат лекарственной коррекции заболевания»¹ [1]. В интерпретации [2, 3] сделан иной акцент: биомаркер – это «показатель, который можно объективно измерить и который может служить индикатором физиологического или патологического процесса или ответа на лекарственную терапию». Авторы источника [4] со ссылкой на источник [3] приводят такое определение: «биомаркер – объективно исследуемый параметр, измерение которого отличается высокой точностью, воспроизводимостью и надежностью, что позволяет отражать интенсивность физиологических процессов, состояние здоровья, степень риска или факт развития болезни, ее стадию и прогноз». Параметр может быть химическим, физическим или биологическим. Биомаркеры используют при оценке физиологических процессов в организме; выявлении заболевания и подборе лечения; прогнозировании течения, прогрессирования и исхода болезни; разработке новых лекарственных препаратов, установлении их лечебного эффекта и побочного действия, выявлении механизма действия [4].

Учитывая большое количество биомаркеров, имеющих разнообразную природу, разработать единую классификацию не удастся. Биомаркеры классифицируют в зависимости от цели применения при диагностике и лечении, от исследуемой системы, от вида исследования, специфичности и др. [4]. Одна из классификаций [1]:

0 тип – маркер, указывающий на наличие заболевания и коррелирующий с его клиническими проявлениями;

I тип – маркер, связанный с терапевтическим эффектом и механизмом действия препарата;

II тип (предиктор клинического исхода, суррогатная конечная точка) – маркер, позволяющий предположить исход заболевания, оценить эффективность лечения.

В зависимости от задачи выделяют следующие группы биомаркеров [2]:

- диагностические, позволяющие установить факт наличия или отсутствия заболевания, степень его тяжести (например, количество гликированного гемоглобина – сахарный диабет);
- прогностические, позволяющие оценить риск развития заболевания или его осложнений (например, полиморфизм генов факторов свертывания крови);
- терапевтические, позволяющие оценить или дать прогноз эффективности лекарственной терапии (например, международное нормализованное отношение – оценка эффективности варфарина, являющаяся стандартизированным показателем, введенным Всемирной организацией здравоохранения для унификации результатов протромбинового теста в разных лабораториях [5]).

Признание того или иного параметра биомаркером чего-либо является многоступенчатым и длительным процессом, подразумевающим анализ результатов широкого спектра клинических, филогенетических и других исследований [6]. Так, авторы обзора [6] обсуждали возможность использования ряда параметров (связанных с генами, кодирующими ферменты комплекса цитохрома P450, семейства уридин-дифосфат глюкоуронозилтрансферазы, гликопротеин P) в качестве фармакогенетических маркеров фармакокинетики противоэпилептических препаратов. Однако пришли к выводу, что из-за неоднозначных результатов исследований и недостатка соответствующих рандомизированных проспективных плацебо-контролируемых исследований достоверные данные по этому вопросу отсутствуют.

Важно отметить, что далеко не каждый лабораторный показатель можно назвать биомаркером. По мнению авторов [2], основной признак биомаркера – его статистически обоснованная взаимосвязь с заболеванием, осложнением, эффектом терапии. Авторы отмечали, что только в результатах 20% проанализированных ими исследований² приведены чувствительность, специфичность, прогностическая ценность показателя. В большинстве работ показатель назван биомаркером на основании его статистически значимого повышения/понижения/появления

¹ US FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS and other Tools) Resource.

² Публикации eLIBRARY.RU за 2014–2024 гг., поиск проводили по ключевым словам «биомаркеры» (biomarkers), «аналитические/биоаналитические методы» (analytical/bioanalytical methods), «количественное определение» (assay, quantification), «валидация» (validation).

при определенной патологии, что явно недостаточно для признания показателя биомаркером.

Учитывая возрастающую роль биомаркеров в диагностике, мониторинге терапии и разработке лекарственных средств, систематизация международных и национальных регуляторных требований, а также научных рекомендаций по определению и применению биомаркеров является актуальной.

Цель работы – обобщение материалов по вопросам валидации биоаналитических методик количественного определения биомаркеров.

При подготовке работы использованы регуляторные документы Международного совета по гармонизации (International Council for Harmonisation, ICH), Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA), включая Рабочую группу по совместному обсуждению анализа биомаркеров (Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group) и Институт критического пути (Critical Path Institute, C-Path), Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA), Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) и иные научные источники, находящиеся в открытом доступе (в том числе по данным электронных баз PubMed, Web of Science, РИНЦ (eLIBRARY.RU), Google Scholar), преимущественно опубликованные в период 2014–2024 гг. Ключевые слова, использованные в поисковых запросах: «биомаркеры» (biomarkers), «аналитические/биоаналитические методы» (analytical/bioanalytical methods), «количественное определение» (assay, quantification), «валидация» (validation).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Клиническая и аналитическая валидация (квалификация) биомаркера. В работе [7] отмечено, что для успешного применения биомаркера его необходимо выбрать, изучить и валидировать. Под валидацией в данном случае понимают процесс подтверждения того, что выбранный биомаркер выполняет свое функциональное назначение (клиническое, диагностическое и др.), а его использование приводит к ожидаемым результатам (выявление заболевания, оценка влияния терапии на течение заболевания, идентификация мишеней лекарственных средств и др.). Документ «Вопросы для обсуждения:

Научное и регуляторное обсуждение аналитической валидации анализов, используемых в квалификации биомаркеров в биологических матрицах»³ выделяет аналитическую валидацию (включает все факторы, которые являются частью процедуры анализа, зависят от приемлемости образцов, критических реагентов и рабочих характеристик оборудования или тестовой системы, включая отбор образцов, их обработку и хранение) и клиническую валидацию биомаркера (направлена на интерпретацию измерений биомаркера, оценку клинической чувствительности, клинической специфичности, клинической точности биомаркера при прогнозировании заявленного результата).

В литературе можно встретить также термин «квалификация биомаркера» [8], который, по-видимому, является синонимом термина «валидация биомаркера»; по нашему мнению, оба этих термина следует отнести к клинической валидации (или клинической квалификации) биомаркера. Также отметим, что во многих работах, посвященных валидации биомаркера, предметом обсуждения являются именно аспекты клинической валидации: прогностической ценности, отклика биомаркера в условиях различных экспериментов, популяций, патологий и др., как в рамках клинического применения, так и в доклинических исследованиях (ДКИ), а также правовые вопросы защиты биоинформации, использования биомедицинских технологий и биоматериалов [9–16]. По мнению авторов [14], по причине отсутствия ширококомасштабных когортных исследований потенциальных биомаркеров, которые подтвердили бы их клиническую значимость, из открытых за прошедшие десятилетия тысяч биомаркеров клиническое применение в медицине нашли менее ста. Таким образом, внимание к клинической валидации биомаркеров безусловно оправдано. Можно также отметить, что чем более общепринятым, широко используемым в клинической практике является какой-либо показатель, тем больше данных (с применением устоявшейся методики его измерения) у значительного числа пациентов и популяций можно получить и проанализировать, тем больше вероятность выявления клинического значения такого показателя и его квалификации в качестве биомаркера.

Вместе с тем данные, положенные в основу клинической валидации (квалификации) биомаркера, должны базироваться на достоверных

³ Piccoli SP, Sauer JM. Points to consider document: scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices. Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group, Critical Path Institute (C-Path); 2019.

способах измерения параметра, являющегося потенциальным биомаркером, – биоаналитических методиках. Поскольку в определениях биомаркера звучат следующие словосочетания: «количественно определяемые», «объективно определяемые», «измерение с высокой точностью, воспроизводимостью и надежностью», становится очевидной необходимость разработки методики количественного определения выбранного биомаркера и ее последующей валидации.

Регуляторные аспекты валидации биоаналитических методик и методик анализа биомаркеров.

Процедура и объем валидации биоаналитических методик регламентированы рядом документов⁴. Руководства направлены на описание процедуры валидации биоаналитических методик, используемых для определения концентраций химических и биологических препаратов и их метаболитов в биологических образцах (кровь, плазма, сыворотка, другие биологические жидкости или ткани), полученных в токсикокинетических (ТК), фармакокинетических (ФК) исследованиях и на всех этапах клинических исследований (КИ), включая сравнительные исследования биодоступности/биоэквивалентности (БЭ). Все документы отмечают отличия в процедуре в отношении хроматографических методов и методов связывания лиганда.

Действие Руководства⁵ распространяется в том числе на методики анализа биомаркеров; в других документах⁶ отмечено, что анализ биомаркеров и биоаналитические методы, используемые для оценки иммуногенности, не входят в сферу действия руководств. Такое разночтение по отношению к биомаркерам, по-видимому, связано с тем, что полный цикл валидационных испытаний является достаточно ресурсозатратной и трудоемкой процедурой, поэтому ее целесообразность на ранних стадиях изучения потенциального биомаркера дискуссионна. Е.С. Дон и соавт. [7] отмечают, что валидацию биомаркера необходимо начинать с валидации анализа его определения (биоаналитической

методики), а часто и с разработки такой методики. Особенности изучения биомаркера – неизвестный диапазон возможных концентраций, их вариабельность, влияние условий отбора и хранения образцов, компонентов матрицы и используемых реагентов. Кроме того, отсутствие хорошо охарактеризованных стандартных образцов для анализа осложняет валидацию таких методик, обуславливает отсутствие единой стратегии и возможность валидации методики определения только для решения определенных задач, допуская непригодность для альтернативных, иных целей [7].

В англоязычной литературе в отношении аналитических методик определения биомаркеров в биологических матрицах закреплены термины context of use (COU) – контекст использования и fit-for-purpose (FFP) – соответствие назначению⁷, подразумевающие, что для поисковых исследований могут быть использованы предварительные результаты оценки потенциального (предполагаемого) биомаркера, в то время как принятие более важных решений должно быть основано на данных по валидированному (квалифицированному) биомаркеру [17]. Соответственно необходимо провести валидационные испытания в объеме, подтверждающем адекватность методики согласно предполагаемому ее применению на конкретном этапе исследований. По мнению A. Safavi⁸, важно постоянно возвращаться к контексту использования анализа. Ответы на вопросы: «для чего будут использованы данные»; «какие выводы будут сделаны на основе анализа»; «будут ли они качественными или количественными»; «будут ли данные о биомаркере использованы для подачи в регулирующие органы, или они нужны только для лучшего понимания механизма действия препарата» составляют основу концепции COU и FFP. Эта концепция, появившаяся в 2005–2006 гг. [17], претерпела ряд изменений и обсуждений как в специальных рабочих группах, так и в ходе широких научных дискуссий в рамках конференций, научных публикаций и др. [18–20] и нашла наиболее

⁴ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 85 «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

Guidance for industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, 2018.

Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009. London, 2011.

ICH M10 on bioanalytical method validation. Scientific guideline. EMA/CHMP/ICH/172948/2019. Amsterdam, 2022.

⁵ Guidance for industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, 2018.

⁶ Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009. London, 2011.

ICH M10 on bioanalytical method validation. Scientific guideline. EMA/CHMP/ICH/172948/2019. Amsterdam, 2022.

⁷ Piccoli SP, Sauer JM. [Points to consider document: scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices. Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group, Critical Path Institute \(C-Path\); 2019.](#)

⁸ Safavi A. [Exploratory biomarker testing: to qualify or validate the assay? 2018.](#)

полное и подробное отражение в документах 2018–2021 гг.⁹ [21]. Правовой статус документа¹⁰, озаглавленного «Вопросы для обсуждения», не ясен – в некоторых работах он отмечен как «окончательный вариант документа» C-Path и FDA [22], но на момент подготовки публикации отсутствует на сайте FDA. По-видимому, он является предшественником руководства, наделенного регуляторным статусом, а его рекомендаций целесообразно придерживаться в практической работе. Отметим, что концепция и документ продолжают быть предметом дальнейшего совершенствования и выработки подходов с учетом различных мнений специалистов в данной области [22–24], а ключевые положения вошли в принятый FDA документ, посвященный применению биомаркеров в КИ новых лекарственных препаратов (ЛП) для животных¹¹.

Этапы и ключевые элементы аналитической валидации биомаркера. Анализ биомаркера в свете концепции FFP – процесс, сопровождающий создание ЛП с использованием биомаркера (независимо от роли биомаркера в данном процессе) и включающий (по мнению [18]) четыре непрерывных этапа: разработку и предварительную валидацию методики, валидацию исследовательской методики, «полную» или обширную валидацию методики и валидацию методики в исследовании (рис. 1). Процедуры измерения

значений биомаркера, которые далее используют для установления и подтверждения точек принятия решений при клинической валидации (квалификации) биомаркера, должны проходить достаточно обширную и строгую аналитическую валидацию, чтобы гарантировать соответствие эффективности анализа применению биомаркера¹². В данной работе мы сфокусированы именно на аналитической части – методике/процедуре измерения параметра.

В большинстве работ выделяют два основных этапа или направления: анализ биомаркера в процессе разработки ЛП и для диагностики¹³ [7, 17, 18, 22, 23], которые определяют глубину/объем валидационных испытаний. Можно также встретить выделение предварительных (скрининговых) этапов [17], частичной валидации (translational/partial validation, отсутствует в более ранних работах [18, 19], упомянута в ключевом документе¹⁴) и сопоставление с объемом валидационных испытаний методики для оценки БЭ, ФК, ТК исследуемых соединений¹⁵ [7, 17]. Упомянутые рекомендации обобщены в *таблице 1*.

Таблица 1 составлена по материалам¹⁶ [7, 17, 18] с дополнениями и изменениями, однако при ее подготовке предпочтение в отношении классификации/этапов валидации отдано ключевому документу¹⁷, в котором не выделяется

⁹ Piccoli SP, Sauer JM. Points to consider document: scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices. Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group, Critical Path Institute (C-Path); 2019.

Guidance for industry. Biomarkers and surrogate endpoints in clinical studies to support effectiveness of new animal drugs. Rockville; 2021.

¹⁰ Piccoli SP, Sauer JM. Points to consider document: scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices. Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group, Critical Path Institute (C-Path); 2019.

¹¹ Guidance for industry. Biomarkers and surrogate endpoints in clinical studies to support effectiveness of new animal drugs. Rockville; 2021.

¹² Piccoli SP, Sauer JM. Points to consider document: scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices. Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group, Critical Path Institute (C-Path); 2019.

¹³ Там же.

¹⁴ Там же.

¹⁵ Там же.

¹⁶ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 85 «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

Piccoli SP, Sauer JM. Points to consider document: scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices. Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group, Critical Path Institute (C-Path); 2019.

Guidance for industry. Biomarkers and surrogate endpoints in clinical studies to support effectiveness of new animal drugs. Rockville; 2021.

Уварова НЕ. Твердые лекарственные формы для приема внутрь с немедленным высвобождением системного действия. Опыт экспертизы документов досье, касающихся исследований биоэквивалентности. Современные подходы к экспертизе и регистрации лекарственных средств (PerLec-2022). Материалы научно-практической конференции. М.: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2022.

¹⁷ Piccoli SP, Sauer JM. Points to consider document: scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices. Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group, Critical Path Institute (C-Path); 2019.

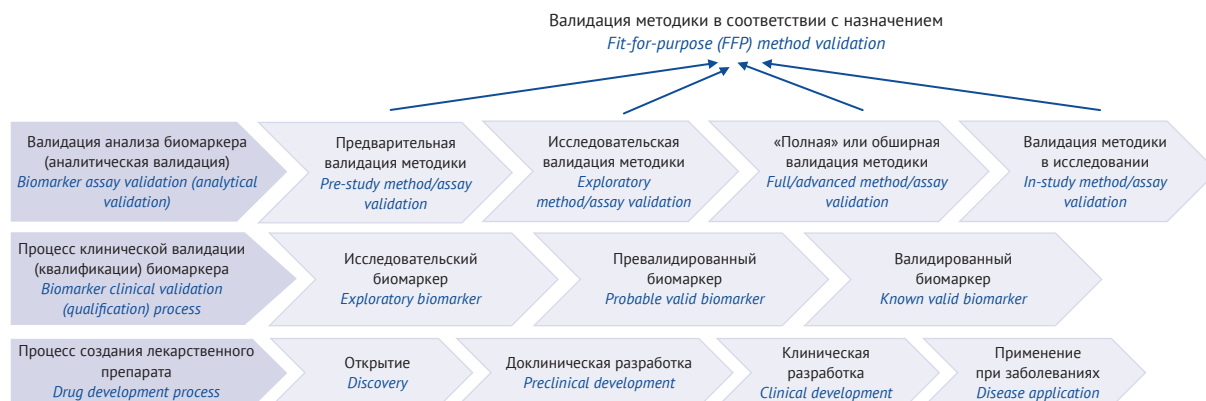


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 1. Интеграция аналитической валидации анализа биомаркеров и процесса его клинической квалификации с разработкой лекарственных препаратов (по материалам [18] с изменениями)

Fig. 1. Integrating analytical validation of biomarker analysis and its clinical qualification with drug development (based on moderated material [18])

Таблица 1. Ключевые элементы валидации биоаналитической методики в зависимости от задачи

Table 1. Key elements of bioanalytical method validation depending on the objective

Параметры <i>Parameters</i>	Анализ биомаркера при исследованиях биоэквивалентности, фармако- и токсикокинетики <i>Biomarker analysis in bioequivalence, pharmacokinetics and toxicokinetics studies</i>	Анализ биомаркера в процессе разработки лекарственных препаратов <i>Biomarker analysis during medicinal product development</i>		Анализ биомаркера для диагностики <i>Biomarker analysis for diagnosis</i>
Стадия создания лекарственного препарата, характер принимаемого решения <i>Stage of medicinal products development, nature of the decision</i>	Регуляторные ДКИ и КИ лекарственных веществ <i>Regulatory pre-CS and CS of medicinal substances</i>	Разработка, скрининг, принятие решения о дальнейшем использовании биомаркера <i>Development, screening, deciding on further use of the biomarker</i>	Трансляционные ДКИ и КИ, выбор биомаркера-кандидата, безопасность, механизм действия (фармакодинамика), выбор дозы, режима дозирования, подтверждение концепции применения биомаркера <i>Translational pre-CS and CS, candidate biomarker selection, safety, mechanism of action (PD), dose selection, dosing regimen, biomarker proof of concept</i>	ДКИ и КИ, выявление заболеваний, патологических состояний, оценка безопасности определения биомаркера для субъекта исследования / пациента, подтверждение диагноза <i>Pre-CS and CS, healthy identification of diseases, pathological conditions, assessment of the safety of biomarker determination for the subject/patient, confirmation of diagnosis</i>
Уровень валидации* <i>Validation level*</i>	Полная валидация <i>Full validation</i>	Исследовательская валидация <i>Discovery exploratory validation</i>	Частичная валидация <i>Translational partial validation</i>	Полная валидация <i>Full advanced validation</i>
Тип результата <i>Result type</i>	Количественный (абсолютный или относительный) <i>Quantitative (absolute or relative)</i>	Качественный, полуколичественный, количественный (абсолютный или относительный) <i>Qualitative, semi-quantitative, quantitative (absolute or relative)</i>		
Аналит <i>Analyte</i>	Экзогенный, эндогенный <i>Exogenous, endogenous</i>	Эндогенный <i>Endogenous</i>		
Матрица <i>Matrix</i>	Аутентичная или суррогатная; параллелизм/линейность отклика <i>Authentic or surrogate; parallelism/linearity of response</i>	Аутентичная или суррогатная; параллелизм (при наличии проб) <i>Authentic or surrogate, parallelism (if samples are available)</i>	Аутентичная или суррогатная; обсуждение статуса заболевания, несколько доноров (не менее 6 источников для хроматографических методов, не менее 10 – для методов связывания лиганда), параллелизм <i>Authentic or surrogate; discussion of the disease status, several donors (at least 6 sources for chromatographic methods, at least 10 – for ligand binding methods), parallelism</i>	

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

<p>Параметры <i>Parameters</i></p>	<p>Анализ биомаркера при исследованиях биоэквивалентности, фармако- и токсикокинетики <i>Biomarker analysis in bioequivalence, pharmaco- and toxicokinetics studies</i></p>	<p>Анализ биомаркера в процессе разработки лекарственных препаратов <i>Biomarker analysis during medicinal product development</i></p>		<p>Анализ биомаркера для диагностики <i>Biomarker analysis for diagnosis</i></p>
<p>Стандартные образцы <i>Standards</i></p>	<p>Как правило, хорошо охарактеризованы <i>Generally well characterised</i></p>	<p>Могут быть недостаточно полно охарактеризованы, могут меняться от поставщика к поставщику, от серии к серии <i>May be poorly characterised, may vary from supplier to supplier, batch to batch</i></p>	<p>Реагенты и стандарты должны быть хорошо охарактеризованы, установлен контроль изменений от партии к партии, соблюдены требования GMP, обеспечена стабильность реагентов <i>Reagents and standards should be well characterised, batch-to-batch change control established, GMP requirements met, stability of reagents ensured</i></p>	
<p>Калибровочные образцы, образцы для контроля качества (КК) <i>Calibration samples, QC samples</i></p>	<p>Модельные смеси с добавками аналита <i>Model mixtures with analyte additives</i></p>	<p>Модельные смеси с добавками аналита, как образцы КК могут быть использованы реальные пробы от животных/человека и (или) лиофилизированные образцы 2–3 уровней концентраций, входящие в наборы реагентов <i>Model mixtures with analyte additives, as QC samples, real samples from animals/humans, and/or lyophilised samples of 2–3 concentration levels from reagent kit can be used</i></p>		
<p>Селективность/специфичность <i>Selectivity/specificity</i></p>	<p>Специфичность к аналиту, селективность в присутствии неродственных примесей в биологическом образце (не менее 6 источников холостых образцов хроматографических методов, не менее 10 – для методов связывания лиганда) <i>Analyte specificity, selectivity in the presence of unrelated impurities in the biological sample (minimum 6 blank sources for chromatographic methods, at least 10 – for ligand binding methods)</i></p>	<p>Специфичность к аналиту; можно использовать эталонный стандарт из набора реагентов <i>Analyte specificity; reference standard from reagent kit can be used</i></p>	<p>Селективность в присутствии других изоформ, ко-медиаторов и эндогенных лигандов; рекомендуется проверить эталонный стандарт из набора реагентов <i>Selectivity in the presence of other isoforms, co-mediators, and endogenous ligands; it is recommended to check the reference standard from the reagent kit</i></p>	
<p>Калибровочная модель <i>Calibration model</i></p>	<p>Чаще линейная (хроматография), выбор математической модели (методы связывания лиганда) <i>More often linear (chromatography), mathematic model selection (ligand binding methods)</i></p>	<p>Выбор математической модели (методы связывания лиганда), реже линейная (хроматография) <i>Mathematic model selection (ligand binding methods), less commonly linear modeler (chromatography)</i></p>		
<p>Калибровочный (аналитический) диапазон <i>Calibration (analytical) range</i></p>	<p>Не менее 6 концентрационных уровней, 3 повторности для хроматографических методов, 6 – для методов связывания лиганда <i>Not less than 6 concentration levels, 3 replicates for chromatographic methods, 6 – for ligand binding methods</i></p>	<p>Не менее 6 концентрационных уровней, 3 повторности <i>Not less than 6 concentration levels, 3 replicates</i></p>	<p>Не менее 6 концентрационных уровней, 6 повторностей <i>Not less than 6 concentration levels, 6 replicates</i></p>	

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Параметры <i>Parameters</i>	Анализ биомаркера при исследованиях биоэквивалентности, фармако- и токсикокинетики <i>Biomarker analysis in bioequivalence, pharmaco- and toxicokinetics studies</i>	Анализ биомаркера в процессе разработки лекарственных препаратов <i>Biomarker analysis during medicinal product development</i>	Анализ биомаркера для диагностики <i>Biomarker analysis for diagnosis</i>
Чувствительность <i>Sensitivity</i>	НПКО определяют на основании критериев приемлемости (минимальный калибровочный стандарт, 3 повторности — для хроматографических методов, 6 — для методов связывания лиганда), возможно определение ПО (чаще используют для методов связывания лиганда, схема из инструкции к коммерческому набору реагентов и/или расчетным путем по соотношению среднего значения аналитического сигнала и стандартного отклонения, SD) Для хроматографии аналитический сигнал для уровня НПКО не менее чем в 5 раз больше, чем сигнал холостого образца <i>LLOQ is determined using acceptance criteria (minimum calibration standard, 3 replicates for chromatographic methods, 6 – for ligand binding methods); LOD can be determined as well (more often used for ligand binding methods, the scheme from the instructions for the commercial reagent kit and/or calculated by the ratio of the average value of the analytical signal and standard deviation, SD)</i> <i>For chromatography, the analytical signal for the LLOQ level is at least 5 times greater than the signal of the blank sample</i>		
Валидация правильности (точности)** и прецизионности*** <i>Validation of accuracy** and precision***</i>	4 уровня КК, 3 повторности, не менее чем в 2 разных дня для хроматографических методов; 5 уровней КК, 6 повторностей, не менее чем в 2 разных дня — для методов связывания лиганда <i>4 QC levels, 3 replicates, not less than 2 different days for chromatographic methods; 5 QC levels, 6 replicates, not less than 2 different days for ligand binding methods</i>	Нет рекомендаций или без уточнения количества уровней, 3 повторности <i>No recommendations or without specifying the number of levels, 3 replicates</i>	По разным источникам: 4–5 уровней КК, 2 повторности; 2–6 уровней, 3–6 повторностей или 4–6 уровней, 6 повторностей <i>According to various sources: 4–5 QC levels, 2 replicates, 2–6 levels, 3–6 replicates or 4–6 levels, 6 replicates</i>
Стабильность**** <i>Stability****</i>	Исходный и рабочие растворы аналита и ВС; заморозка/разморозка, краткосрочная и длительная стабильность, пробы с добавками в матрицу <i>Stock and working solutions of analyte and IS freezing/thawing, short-term and long-term stability, matrix spiked samples</i>	Краткосрочная стабильность, в т.ч. при комнатной температуре, в холодильнике (до 4 ч), 1 цикл разморозка/заморозка <i>Short-term stability, can include at room temperature, in the refrigerator (up to 4 hours), 1 defrosting/freezing cycle</i>	По разным источникам: стабильность реагентов; заморозка/разморозка (3 цикла), краткосрочная (комнатная температура, холодильник — до 24 ч) и длительная стабильность (–20 °С и (или) –80 °С, 1–2 года, пробы с добавками в матрицу и (или) анализируемые образцы) <i>According to various sources: stability of reagents; freezing/thawing (3 cycles), short-term (room temperature, refrigerator – up to 24 hours) and long-term stability (–20°C and/or –80°C, 1–2 years, samples with additives to the matrix and/or analysed samples)</i>
Параллелизм, минимально необходимое разведение, линейность разведения <i>Parallelism, minimum required dilution, dilution linearity</i>	Необходимы, преимущественно для методов связывания лиганда (линейность разведения актуальна и для хроматографических методов, рекомендовано не менее 5 определений на каждое разбавление, правильность и прецизионность в пределах ±15%) <i>Necessary, mainly for ligand binding methods (linearity of dilution is also relevant for chromatographic methods, at least 5 determinations per dilution, accuracy and precision within ± 15% are recommended)</i>		
Критерии приемлемости <i>Acceptance criteria</i>	Критерии приемлемости установлены регуляторными документами***** <i>Acceptance criteria are established by regulatory documents*****</i>	Критерии приемлемости не требуются, устанавливаются по результатам оценки <i>Acceptance criteria are not required, established based on the assessment results</i>	Критерии приемлемости устанавливают по результатам оценки и технологически обоснованных аналитических соображений (в т.ч. ДИ, 2SD и др.), могут быть приближены и/или аналогичны принятым для БЭ <i>Acceptance criteria are established based on the results of the assessment and technologically sound analytical considerations (including the CI, 2SD, etc.), can be approximated and/or similar to those adopted for BE</i>

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Параметры <i>Parameters</i>	Анализ биомаркера при исследованиях биоэквивалентности, фармако- и токсикокинетики <i>Biomarker analysis in bioequivalence, pharmaco- and toxicokinetics studies</i>	Анализ биомаркера в процессе разработки лекарственных препаратов <i>Biomarker analysis during medicinal product development</i>		Анализ биомаркера для диагностики <i>Biomarker analysis for diagnosis</i>
Документация <i>Documents</i>	План/отчет о валидации <i>Validation plan/report</i>	Описание анализа и результатов, инструкция к коммерческим наборам реагентов <i>Description of analysis and results, instructions for commercial reagent kits</i>	План/отчет о валидации <i>Validation plan/report</i>	
Регуляторные требования <i>Regulatory requirements</i>	Соответствие принципам GLP <i>Compliance with GLP principles</i>	Нет специфических рекомендаций, но соблюдение принципов GLP гарантирует прослеживаемость этапов и результатов <i>No specific recommendations, but adherence to GLP principles ensures traceability of milestones and outcomes</i>		Методы одобрены FDA, формирование результатов соответствует рекомендациям для КИ (если применимо) <i>FDA-approved methods, results are consistent with CT recommendations (if applicable)</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Сокращения. ВС – внутренний стандарт, ДИ – доверительный интервал, ДКИ – доклинические исследования, КИ – клинические исследования, КК – контроль качества, НПКО – нижний предел количественного определения, ПО – предел обнаружения, ФД – фармакодинамика, FDA – Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration), GLP – Надлежащая лабораторная практика (Good laboratory practice), GMP – Надлежащая производственная практика (Good manufacturing practice), SD – стандартное отклонение (standard deviation)

Abbreviations. IS, internal standard; pre-CS, pre-clinical study; CI, confidence interval; CS, clinical study; FDA, Food and Drug Administration; GLP, Good laboratory practice; GMP, Good manufacturing practice; LLOQ, lower limit of quantification; LOD, limit of detection; PD, pharmacodynamics; QC, quality control; SD, standard deviation

* критерии проверки в исследовании (in-study validation) определяют по итогам валидации и формулируют по аналогии с критериями приемлемости при анализе испытуемых образцов (Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 85 «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза»; Guidance for industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, 2018);

** для гетерогенных (высокомолекулярных) биомаркеров калибраторы обычно получают с рекомбинантным эталонным материалом в суррогатной матрице. Анализ позволяет оценить только относительную точность. Этот термин подходит почти для всех биомаркеров, где калибровочный материал (стандартный образец и матрица) отличается от эндогенного биомаркера;

*** более подробные рекомендации по дизайну (объему) экспериментов по оценке прецизионности при валидации анализа биомаркера приведены в таблице 7 документа [Piccoli SP, Sauer JM. Points to consider document: scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices. Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group, Critical Path Institute \(C-Path\); 2019;](#)

**** для гетерогенных (высокомолекулярных) биомаркеров в случае использования меченых эталонных стандартов анализ не может дать представление о стабильности эндогенных биомаркеров, только о стабильности рекомбинантной молекулы;

***** Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 85 «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза»; Guidance for industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, 2018; Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009. London, 2011; ICH M10 on bioanalytical method validation – Scientific guideline. EMA/CHMP/ICH/172948/2019. Amsterdam, 2022.

* in-study validation criteria are based on validation results and formulated in the same way as the acceptance criteria for test sample analysis.

** for heterogeneous (high molecular weight) biomarkers, calibrators are usually prepared with recombinant reference material in a surrogate matrix. The analysis evaluates only relative accuracy. The term is appropriate for almost all biomarkers where the calibration material (reference standard and matrix) differs from the endogenous biomarker.

*** refer to Table 7 in [Piccoli SP, Sauer JM. Points to consider document: scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices. Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group, Critical Path Institute \(C-Path\); 2019.](#) for more detailed recommendations on the design (scope) of experiments to evaluate the precision of biomarker assay validation.

**** for heterogeneous (high molecular weight) biomarkers, when using labelled reference standards, the analysis cannot provide endogenous biomarkers stability, but only recombinant molecule stability.

***** ECE Council Resolution No. 85 of 03.11.2016 "On Procedure of Bioequivalence Studies in the EAEU"; Guidance for industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, 2018; Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/ICH/172948/2019. Amsterdam, 2022.

этап предварительной валидации методики. В аспекте рассмотрения преаналитических вопросов и разработки методики этот этап был затронут в работе [17] и включал такие элементы, как характеристика источников реагентов и стандартных образцов, оценка нижнего предела количественного определения (НПКО) и предварительного аналитического диапазона, правильности и прецизионности методики (без конкретных рекомендаций по количеству концентрационных уровней и повторностей), тип калибровочной зависимости, специфичность реагентов (по информации от поставщика или из литературы), матричный эффект, условия сбора, обработки, хранения реагентов и проб и др. Данный этап следует рассматривать как подготовительный, поисковый, не заканчивающийся анализом экспериментальных проб с получением значений, от которых зависит принятие решений в рамках исследования препаратов. Позднее авторами¹⁸ также была отмечена значимость преаналитических факторов (тип биоматериала, интерференция, процедура отбора, лабораторная посуда и инструменты для отбора биоматериала, время и условия отбора, первичная обработка образцов, хранение и дальнейшая логистика, заморозка/разморозка¹⁹), которым необходимо уделять внимание по мере разработки и валидации методики, стандартизовать их, определять границы применимости (приемлемости) вариаций.

На ранних этапах исследований биомаркеров (скрининг, выбор биомаркера, оценка его полезности) может быть достаточно простого и минимально подтвержденного анализа (табл. 1, исследовательская валидация). Однако при клинической квалификации биомаркера (оценка терапевтической эффективности создаваемого ЛП, диагностика и др. как в рамках ДКИ, так и КИ) потребуются аналитически подтвержденный результат. Вместе с тем необходимый объем испытаний, по мнению разных источников, варьируется, а критерии выбора, к какому этапу/задаче следует отнести валидируемую методику в случае анализа биомаркера, не сформулированы или неоднозначны, что, безусловно,

затрудняет формирование единого алгоритма аналитической валидации биомаркеров.

Анализируя объединенные рекомендации (табл. 1), можно отметить, что ключевые показатели, предусмотренные при аналитической валидации биоаналитической методики, схожи независимо от задачи, для решения которой она предназначена. Аналитическая валидация биомаркера в целом должна включать оценку семи параметров: точность (правильность), диапазон аналитических измерений (включая НПКО и верхний предел количественного определения (ВПКО)), параллелизм (минимально необходимое разведение и линейность разбавления, если применимо), прецизионность (внутри и между циклами, операторами, днями, лотами реагентов, если применимо), селективность, специфичность и стабильность (в рабочих условиях и краткосрочная, долгосрочная, при заморозке/разморозке).

В некоторых случаях может потребоваться информация о дополнительных аналитических параметрах, включая устойчивость, оценку межлекарственных взаимодействий и др.²⁰. Авторы [22] подчеркивали, что в документе²¹ сделан акцент на важность оценки параллелизма и представлена концепция допустимой общей аналитической ошибки (total analytical error, TAE). Отметим, что понятие общей аналитической ошибки, состоящей из суммы ошибки при определении правильности (относительной систематической погрешности, δ) и прецизионности (CV), которая не должна превышать 30% (для ВПКО и НПКО 40%), присутствует в отношении методов связывания лиганда в уже действующих документах²².

Валидационные параметры, процедуры и критерии приемлемости для анализа биомаркеров близки, хотя и могут быть не идентичны изложенным в отношении получения данных по БЭ, ФК, ТК²³. Именно этот документ отмечает, что «валидация метода для анализа биомаркеров должна решать те же вопросы, что и валидация метода для анализа лекарственных препаратов. ... Подход, используемый для анализа лекарственных препаратов, должен быть отправной

¹⁸ Piccoli SP, Sauer JM. Points to consider document: scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices. Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group, Critical Path Institute (C-Path); 2019.

¹⁹ Там же.

²⁰ Там же.

²¹ Там же.

²² Решение Совета ЕЭК от 3.11.2016 № 85 «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

Guidance for industry: Bioanalytical method for validation. Rockville; 2018.

ICH M10 on bioanalytical method validation – Scientific guideline. EMA/CHMP/ICH/172948/2019. Amsterdam, 2022.

²³ Guidance for industry: Bioanalytical method for validation. Rockville; 2018.

точкой для проверки анализа биомаркеров, хотя некоторые характеристики могут не применяться или могут потребоваться различные соображения»²⁴.

Необходимо также осветить позицию A. Safavi²⁵, в которой представлены отличия/сходства валидации и квалификации биомаркеров, по-видимому, с точки зрения только аналитических аспектов этих процессов (не затрагивая клиническую валидацию/квалификацию биомаркера). По его мнению, оба процесса направлены на доказательство того, что тест подходит для достижения предполагаемой цели, но различаются в отношении глубины и надежности оцениваемых параметров и количества повторов, выполненных для каждого параметра. Объем квалификационных процедур, рекомендованный автором, сопоставим с исследовательской и (или) частичной валидациями (табл. 1). Также отметим, что понятие «квалификация аналитической методики» практически не встречается в научной литературе и регуляторных документах.

Особенности аналитической валидации биомаркера, обусловленные используемыми аналитическими методами. Некоторые аспекты, которые следует учитывать при валидации методики анализа биомаркеров, обусловлены особенностями метода, лежащего в ее основе, зависящего от природы измеряемого биомаркера (белок, липид и др.), наличия уже разработанных методик, наборов реагентов, особенностей реализации измерений (малый объем проб, лабораторные или полевые условия, квалификация персонала и др.), требований к чувствительности и селективности, а также доступности метода²⁶. Как правило, для анализа биомаркера могут быть рассмотрены планшетные методики и различные методы обнаружения, включая флуоресценцию, хемилюминесценцию, электрохемилюминесценцию, хромогенное обнаружение, масс-спектрометрию и относительно новые акустические системы обнаружения²⁷. Согласно данным источника [23], большинство методик анализов биомаркеров основаны на одном из трех методов:

- хроматографические методики, которые должны быть разработаны *de novo*;

- лиганд-связывающие методики, которые должны быть разработаны *de novo*;
- лиганд-связывающие методики с использованием коммерческих наборов реагентов.

Коммерческие наборы реагентов [25] могут быть разрешены для диагностики *in vitro*, для клинических лабораторных испытаний или исключительно для использования в исследовательских целях. Коммерческие наборы реагентов должны быть проверены на каждом анализируемом объекте (матрице) [22]. Необходимость валидации и параметры валидации клинических лабораторных наборов могут варьировать в каждом конкретном случае в зависимости от предполагаемого использования или характеристик биомаркеров. По-видимому, в этой ситуации корректно говорить о верификации методики, направленной на подтверждение того, что требования, заложенные при ее валидации, введенной ранее (например, производителем набора реагентов), выполнены в условиях конкретной лаборатории (с использованием набора определенной серии на оборудовании, имеющемся в распоряжении лаборатории). Эти аспекты аналогичны рассмотренным в работе [26] применительно к деятельности клинико-диагностических лабораторий, которые проводят в том числе биомедицинские анализы на биомаркеры. Минимальный перечень испытаний при верификации клинико-лабораторных исследований должен включать оценку промежуточной прецизионности, правильности, линейности и диапазона измерений калибровочной зависимости, верификацию калибровки, а также подтверждение возможности использования биологических референтных интервалов, указанных в инструкции производителя (если применимо) [26].

Полную валидацию исследовательских наборов (предназначенных исключительно для исследований) проводят независимо от наличия валидационной информации, сопровождающей набор [22]. Принимать решение об использовании такого набора целесообразно после полного рассмотрения вопроса о том, соответствует ли он предполагаемому использованию или характеристикам соответствующего биомаркера (таким как диапазон

²⁴ Piccoli SP, Sauer JM. Points to consider document: scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices. Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group, Critical Path Institute (C-Path); 2019.

Guidance for industry: Bioanalytical method for validation. Rockville; 2018.

²⁵ Safavi A. Exploratory biomarker testing: to qualify or validate the assay? 2018.

²⁶ Piccoli SP, Sauer JM. Points to consider document: scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices. Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group, Critical Path Institute (C-Path); 2019.

²⁷ Там же.

калибровки или специфичность). Эталонный стандарт, входящий в состав такого набора, рекомендовано оценивать с использованием других коммерчески доступных продуктов, уделяя внимание отличиям от эндогенного вещества, являющегося целевым аналитом. Когда партия набора меняется, рекомендовано подтвердить, что различия в концентрации аналита в одном и том же образце между партиями являются приемлемыми. Поскольку исследовательские наборы могут стать недоступными (прекращение выпуска, нарушение экономических связей, поставок), следует рассмотреть альтернативные подходы к анализу (например, использование реагентов, доступных по отдельности, не в составе набора, если применимо).

Выбор уровня аналитической валидации биомаркера в зависимости от метода и решаемых задач. В практике ДКИ, проводимых *in vivo* с участием различных видов лабораторных животных и *in vitro* с применением буферных сред, клеточных линий, изолированных органов и др., могут быть использованы клинические и исследовательские наборы как специфичные для измеряемого маркера, вида животных и типа биологической матрицы, так и имеющие иное исходное предназначение. Расширение диапазона применения набора по сравнению с рекомендациями производителя в случае оценки БЭ, ФК, ТК требует проведения полной валидации биоаналитической методики, в иных случаях (в том числе для оценки фармакодинамики) – в зависимости от характера решаемой задачи: на этапе

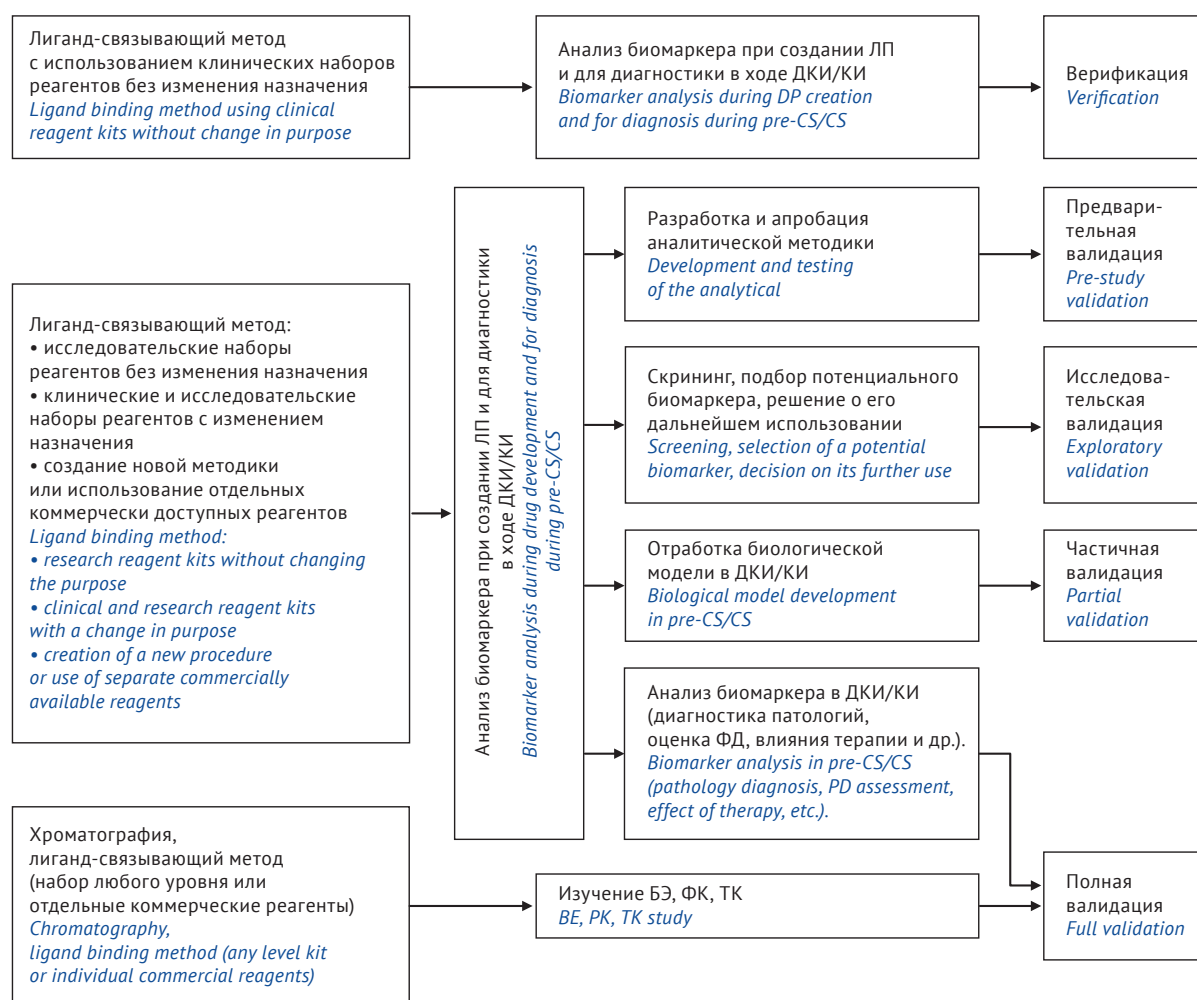


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 2. Выбор уровня аналитической валидации биомаркера в зависимости от особенностей метода и решаемых задач; БЭ – биоэквивалентность, ДКИ – доклинические исследования, КИ – клинические исследования, ЛП – лекарственный препарат, ТК – токсикокинетика, ФД – фармакодинамика, ФК – фармакокинетика

Fig. 2. Choosing analytical validation level of a biomarker depending on the method characteristics and the objectives; BE, bioequivalence; pre-CS, pre-clinical study; CS, clinical study; D, medicinal product; TK, toxicokinetics; PD, pharmacodynamics; PK, pharmacokinetics

подбора биомаркера, по-видимому, можно ограничиться исследовательским уровнем валидации, при переходе к отработке модели с применением выбранного биомаркера целесообразно повысить уровень валидации биоаналитической методики до частичного, который близок по объему к полной валидации методики анализа биомаркера, необходимой при решении задач ДКИ/КИ, предполагающих диагностику патологий, оценку влияния терапии на ее течение и др. (табл. 1). Схожая схема может быть рекомендована и в ряде других ситуаций (рис. 2).

Таким образом, только вариант использования клинических наборов реагентов без изменения назначения позволяет минимизировать процедуру подтверждения пригодности методики, во всех остальных случаях потребуются сравнительно объемные валидационные испытания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Расширение использования биомаркеров в качестве инструментов разработки лекарственных

препаратов обуславливает необходимость совершенствования методов их аналитического количественного определения. Очевидно, что использованию биомаркера должна предшествовать процедура подтверждения пригодности методики для применения согласно планируемым целям, близкая к общепринятой процедуре валидации биоаналитических методик. Сопоставлены ключевые элементы валидации биоаналитических методик анализа биомаркеров и рассмотрен выбор уровня их аналитической валидации в зависимости от особенностей метода и решаемых задач. Необходимо широкое научное обсуждение деталей валидации анализа биомаркеров, поскольку для этой сложной процедуры пока отсутствует единый алгоритм. Такое обсуждение будет способствовать более надежному использованию биомаркеров, повышению качества сопутствующих этому процессу исследований и конечному результату – введению в обращение новых эффективных и безопасных лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Мирошниченко ИИ, Птицина СН. Биомаркеры в современной медико-биологической практике. *Биомедицинская химия*. 2009;5(4):425–40. Miroshnichenko II, Pti-tsyna SN. Biomarkers in the modern medical and biologic practice. *Biomedical Chemistry*. 2009;55(4):425–40 (In Russ.). EDN: [KWROID](#)
2. Кочетов АГ, Лянг ОВ, Жирова ИА, Ивойлов ОО. Лабораторные исследования в медицине. *Терапевтический архив*. 2020;92(4):4–8. Kochetov AG, Lyang OV, Zhirona IA, Ivoilov OO. Laboratory diagnostics in medicine. *Therapeutic Archive*. 2020;92(4):4–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.04.000501>
3. Biomarkers Definitions Working Group Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
4. Осипова ТВ, Бухман ВМ. Биомаркеры трансляционной медицины. *Российский биотерапевтический журнал*. 2018;17(1):6–13. Osipova TV, Bukhman VM. Biomarkers of translational medicine. *Rus J Biotherapy*. 2018;17(1):6–13 (In Russ.). <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2018-17-1-6-13>
5. Ansari D, Aronsson L, Sasor A, et al. The role of quantitative mass-spectrometry in the discovery of pancreatic cancer biomarkers for translational science. *J Transl Med*. 2014;12:87. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-87>
6. Насырова РФ, Сивакова НА, Липатова ЛВ и др. Биологические маркеры эффективности и безопасности противосудорожных препаратов: фармакогенетика и фармакокинетика. *Сибирское медицинское обозрение*. 2017;(1):17–25. Nasurova RF, Sivakova NA, Lipatova LV, et al. Biological markers of the antiepileptic drugs efficacy and safety: Pharmacogenetics and pharmacokinetics. *Siberian Medical Review*. 2017;(1):17–25 (In Russ.). <https://doi.org/10.20333/2500136-2017-1-17-25>
7. Дон ЕС, Тарасов АВ, Эпштейн ОИ, Тарасов СА. Биомаркеры в медицине: поиск, выбор, изучение и валидация. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017;62(1):52–9. Don ES, Tarasov AV, Epshtein OI, Tarasov SA. The biomarkers in medicine: search, choice, study and validation. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2017;62(1):52–9 (In Russ.). EDN: [YHEYHX](#)
8. Bakker E, Hendrikse NM, Ehmann F, et al. Biomarker qualification at the European Medicines Agency: A review of biomarker qualification procedures from 2008 to 2020. *Clin Pharmacol Ther*. 2022;112(1):69–80. <https://doi.org/10.1002/cpt.2554>
9. Метельская ВА, Жаткина МВ, Гаврилова НЕ и др. Валидация комбинированных маркеров наличия и выраженности коронарного атеросклероза. *Профилактическая медицина*. 2020;23(6–2):65–71. Metelskaya VA, Zhatkina MV, Gavrilova NE, et al. Validation of combined markers of the presence and severity of coronary atherosclerosis. *Russian Journal of Preventive Medicine*. 2020;23(6–2):65–71 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/profmed20202306265>
10. Metelskaya VA, Gavrilova NE, Zhatkina MV, et al. A novel integrated biomarker for evaluation of risk and severity of coronary atherosclerosis, and its validation. *J Pers Med*. 2022;12(2):206. <https://doi.org/10.3390/jpm12020206>
11. Конради АО. Биомаркеры, их типы и основы применения в персонализированной медицине. *Российский журнал персонализированной медицины*. 2022;2(3):6–16. Konradi AO. Biomarkers, types and role in personalized medicine. *Russian Journal for Personalized Medicine*. 2022;2(3):6–16 (In Russ.). <https://doi.org/10.18705/2782-3806-2022-2-3-6-16>
12. Тихонова ГА, Котов ОВ, Маркин АА. Биомаркеры как инструмент медико-биологического мониторинга и контроля (Обзор литературы. Часть 1). *Технологии живых систем*. 2023;20(2):18–26. Tikhonova GA, Kotov OV, Markin AA. Biomarkers in the practice of biology and medicine (Literature review. Part 1). *Technologies of Living Systems*. 2023;20(2):18–26 (In Russ.). <https://doi.org/10.18127/j20700997-202302-02>
13. Тихонова ГА, Котов ОВ, Маркин АА. Биомаркеры как инструменты медико-биологического мониторинга и контроля (Обзор литературы. Часть 2). *Технологии живых систем*. 2023;20(4):5–18. Tikhonova GA, Kotov OV,

- Markin AA. Biomarkers in the practice of biology and medicine (Literature review. Part 2). *Technologies of Living Systems*. 2023;20(4):5–18 (In Russ.). EDN: [WTPFOX](#)
14. Калишьян МС. Биологические маркеры в современной ветеринарной практике. *Ветеринарная патология*. 2022;(4):40–8. Kalishyan MS. Biological markers in modern veterinary practice. *Russian Journal of Veterinary Pathology*. 2022;(4):40–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.23947/1682-5616-2022-4-40-48>
 15. Вавилова ВА, Фаустова НМ, Пелешок АА и др. Белок S100b как биологический маркер повреждения нервной ткани у лабораторных животных в доклинических исследованиях. *Трансляционная медицина*. 2024;11(4):342–50. Vavilova VA, Faustova NM, Peleshok AA, et al. S100b protein as a biological marker of nerve tissue damage in laboratory animals in preclinical studies. *Translational Medicine*. 2024;11(4):342–50 (In Russ.). <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2024-11-4-342-350>
 16. Мирошников МВ, Султанова КТ, Макарова МН и др. Комплексная оценка функционального состояния мочевыделительной системы в доклинических исследованиях. Часть 2. Маркеры нефротоксичности (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(4):448–62. Miroshnikov MV, Sultanova KT, Makarova MN, et al. Complex assessment of the functional state of the urinary system in preclinical studies. Part 2. Markers of nephrotoxicity (Review). *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(4):448–62 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-631>
 17. Lee JW, Devanarayan V, Barrett YC, et al. Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharm Res*. 2006;23(2):312–28. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-9045-3>
 18. Chau CH, Rixe O, McLeod H, Figg WD. Validation of analytic methods for biomarkers used in drug development. *Clin Cancer Res*. 2008;14(19):5967–76. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4535>
 19. Hunter DJ, Losina E, Guermazi A, et al. A pathway and approach to biomarker validation and qualification for osteoarthritis clinical trials. *Curr Drug Targets*. 2010;11(5):536–45. <https://doi.org/10.2174/138945010791011947>
 20. Lowes S, Ackermann BL. AAPS and US FDA Crystal City VI workshop on bioanalytical method validation for biomarkers. *Bioanalysis*. 2016;8(3):163–7. <https://doi.org/10.4155/bio.15.251>
 21. Selby PJ, Banks RE, Gregory W, et al. *Methods for the evaluation of biomarkers in patients with kidney and liver diseases: Multicentre research programme including ELUCIDATE RCT*. Southampton (UK): NIHR Journals Library; 2018. <https://doi.org/10.3310/pgfar06030>
 22. Ohtsu Y, Tanaka S, Igarashi H, et al. Analytical method validation for biomarkers as a drug development tool: Points to consider. *Bioanalysis*. 2021;13(18):1379–89. <https://doi.org/10.4155/bio-2021-0173>
 23. Ohtsu Y, Matsumaru T, Katashima M, et al. Biomarker assay validation for clinical trials: A questionnaire survey to pharmaceutical companies in Japan. *Bioanalysis*. 2019;11(2):55–60. <https://doi.org/10.4155/bio-2018-0257>
 24. Mathews J, Amaravadi L, Eck S, et al. Best practices for the development and fit-for-purpose validation of biomarker methods: A conference report. *AAPS Open*. 2022;8:2. <https://doi.org/10.1186/s41120-021-00050-1>
 25. Khan MU, Bowsher RR, Cameron M, et al. Recommendations for adaptation and validation of commercial kits for biomarker quantification in drug development. *Bioanalysis*. 2015;7(2):229–42. <https://doi.org/10.4155/bio.14.274>
 26. Проценко ВН, Ивков АГ. Валидация и верификация количественных методик клинических лабораторных исследований. *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. 2019;8(2):171–9. Procenko VN, Ivkov AG. Validation and verification of quantitative methods of clinical laboratory studies. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe*. 2019;8(2):171–9 (In Russ.). EDN: [AIPHJT](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: В.М. Косман – сбор, обработка и систематизация данных, написание текста рукописи; М.В. Карлина – идея публикации, обсуждение формы представления материала и иллюстраций; Н.М. Фаустова – обсуждение результатов и иллюстраций; В.Г. Макаров, М.Н. Макарова – критический пересмотр текста рукописи и иллюстративного материала.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Vera M. Kosman collected, processed and systematised data, and drafted the manuscript. Marina V. Karlina conceived the study, discussed material presentation and illustrations. Natalia M. Faustova discussed the results and illustrations. Valery G. Makarov and Marina N. Makarova critically revised the manuscript and illustrative material.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Косман Вера Михайловна, канд. фарм. наук / Vera M. Kosman, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>

Карлина Марина Валерьевна, канд. биол. наук / Marina V. Karlina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>

Фаустова Наталья Михайловна, канд. хим. наук / Natalia M. Faustova, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук / Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>

Макаров Валерий Геннадьевич, д-р мед. наук / Valery G. Makarov, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>

Поступила 16.05.2025

После доработки 25.06.2025

Принята к публикации 07.08.2025

Online first 05.09.2025





Received 16 May 2025

Revised 25 June 2025

Accepted 7 August 2025

Online first 5 September 2025



А.В. Митишев¹ 
Е.Е. Курдюков¹ 
М.Г. Макарецва¹ 
Я.М. Немова¹,
Д.Г. Елистратов² 
А.С. Паксяев³

Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве гречихи красностебельной (*Fagopyrum rubricaulis*) методом спектрофотометрии

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Пензенский государственный университет», ул. Красная, д. 40, г. Пенза, 440026, Российская Федерация

² Общество с ограниченной ответственностью «Парафарм», ул. Добровольцев, д. 62, лит. А, Санкт-Петербург, 198334, Российская Федерация

³ Общество с ограниченной ответственностью «Импульс», ул. Коммунистическая, д. 21-б, г. Пенза, 440039, Российская Федерация

✉ Митишев Александр Владимирович; smitishev@mail.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Гречиха красностебельная (*Fagopyrum rubricaulis*, сем. *Polygonaceae*) отличается высоким содержанием флавоноидов, в первую очередь рутина, а в надземной части – кверцетина, изокверцетина, ориентина, витексина, изоориентина, изовитексина и других соединений. Известные фармакологические эффекты гречихи красностебельной – антиоксидантное, кардиопротекторное, гипогликемическое, антибактериальное действие – зависят от комплекса содержания флавоноидов в растительном сырье, поэтому траву гречихи целесообразно стандартизировать по сумме флавоноидов. Однако в отечественной литературе недостаточно информации по стандартизации сырья гречихи красностебельной, в связи с чем разработка методики количественного определения флавоноидов является актуальной.

ЦЕЛЬ. Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в траве гречихи красностебельной с использованием спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Объектом исследования являлась трава гречихи красностебельной. В процессе извлечения были использованы различные экстрагенты (вода очищенная и спирт этиловый 40, 70 и 95%). Подтверждение наличия флавоноидов в сырье проводили методом тонкослойной хроматографии. Для количественного определения флавоноидов в траве гречихи красностебельной был использован спектрофотометрический метод, основанный на измерении оптической плотности раствора в присутствии алюминия хлорида. Валидацию методики проводили согласно Государственной фармакопее Российской Федерации XV издания.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Согласно результатам идентификации методом тонкослойной хроматографии водно-спиртовые извлечения травы гречихи содержали флавоноиды. Способ количественного определения суммы флавоноидов в сырье гречихи красностебельной методом дифференциальной спектрофотометрии предполагает предварительное получение водно-спиртового извлечения путем однократной экстракции точной навески 1 г травы гречихи, измельченной до размера частиц не более 2 мм, спиртом этиловым 40% в соотношении сырье : экстрагент 1:25 при продолжительности экстракции 30 мин. Максимумы поглощения комплексов экстрактов с растворами алюминия хлорида наблюдались при длине волны 410 нм, что соответствовало максимуму поглощения раствора стандартного образца рутина. Количественное определение суммы

флавоноидов проводили в пересчете на рутин. Получены результаты валидации методики по критериям: специфичность, линейность, повторяемость, внутрилабораторная воспроизводимость. С помощью разработанной методики были проанализированы четыре образца травы гречихи красностебельной производства ООО «Парафарм». Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин варьировало от $9,15 \pm 0,20$ до $9,55 \pm 0,11\%$.





ВЫВОДЫ. Разработана и валидирована спектрофотометрическая методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве гречихи красностебельной. Данная методика может быть использована для стандартизации лекарственного сырья гречихи красностебельной.

Ключевые слова: валидация; флавоноиды; трава гречихи красностебельной; спектрофотометрия; рутин; тонкослойная хроматография; стандартизация лекарственного сырья

Для цитирования: Митишев А.В., Курдюков Е.Е., Макартцева М.Г., Немова Я.М., Елистратов Д.Г., Паксяев А.С. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве гречихи красностебельной (*Fagopyrum rubricaulis*) методом спектрофотометрии. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(5):565–573. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-689>

Финансирование. Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда, проект № 24-25-20155.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Alexander V. Mitishev¹ ✉ 
Evgeny E. Kurdyukov¹ 
Marina G. Makartseva¹ 
Yana M. Nemova¹,
Dmitry G. Elistratov² 
Alexey S. Paksyayev³

Development and Validation of an Analytical Procedure for the Quantitative Determination of Total Flavonoids in Red-Stem Buckwheat Herb (*Fagopyrum rubricaulis*) by Spectrophotometry

¹ Penza State University,
40 Krasnaya St., Penza 440026, Russian Federation

² Parapharm LLC,
62A Dobrovoltsev St., St Petersburg 198334, Russian Federation

³ Impulse LLC,
21B Kommunisticheskaya St., Penza 440039, Russian Federation

✉ Alexander V. Mitishev; smitishev@mail.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Red-stem buckwheat (*Fagopyrum rubricaulis*, Polygonaceae family) is characterised by a high content of flavonoids, primarily rutin. The aerial parts of the plant also contain quercetin, isoquercetin, orientin, vitexin, isoorientin, isovitexin, and other compounds. *F. rubricaulis* has antioxidant, cardioprotective, hypoglycaemic, and antibacterial pharmacological effects, which are attributed to the complex of flavonoids in the plant. Therefore, *F. rubricaulis* herb can be standardised using the content of total flavonoids. However, Russian publications lack information on the standardisation of *F. rubricaulis* herbal drugs. This motivates the development of an analytical procedure for the quantitative determination of flavonoids in *F. rubricaulis*.

AIM. This study aimed to develop and validate an analytical procedure for the quantitative determination of flavonoids in *F. rubricaulis* herb by spectrophotometry.

MATERIALS AND METHODS. The study involved extracting *F. rubricaulis* herb samples using several extraction solvents (purified water and 40%, 70%, and 95% ethanol). The presence of flavonoids in the herbal drug was confirmed by thin-layer chromatography (TLC). The content of flavonoids in *F. rubricaulis* herb was determined using a spectrophotometric procedure based on measuring the absorbance of the test solution in the presence of aluminium chloride. The analytical procedure was validated according to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (edition XV).

RESULTS. The TLC identification confirmed that the *F. rubricaulis* herb hydroalcoholic extracts contained flavonoids. The analytical procedure for the quantitative determination of flavonoids by differential spectrophotometry involved preliminary single-step hydroalcoholic extraction (herbal drug sample size: 1 g, accurately weighed; fragment size: ≤ 2 mm; extraction solvent: 40% ethanol; sample-to-solvent ratio: 1:25; extraction time: 30 minutes). The absorption maxima of the complexes of flavonoids with aluminium chloride were at 410 nm, which corresponded to the absorption maximum of the rutin standard solution. The content of total flavonoids was expressed as rutin. The analytical procedure was validated for specificity, linearity, repeatability, and intermediate precision. The developed analytical procedure was used to test 4 samples of *F. rubricaulis* herb manufactured by Parafarm LLC. The content of total flavonoids (expressed as rutin) ranged from $9.15 \pm 0.20\%$ to $9.55 \pm 0.11\%$.

CONCLUSIONS. This study developed and validated a spectrophotometric analytical procedure for the quantitative determination of the content of total flavonoids (expressed as rutin), which can be used to standardise *F. rubricaulis* herbal drugs.

Keywords: validation; flavonoids; red-stem buckwheat; *Fagopyrum rubricaulis* herb; spectrophotometry; rutin; thin-layer chromatography; standardisation rubricaulis herbal drugs.

For citation: Mitishev A.V., Kurdyukov E.E., Makartseva M.G., Nemova Ya.M., Elistratov D.G., Paksyaev A.S. Development and validation of an analytical procedure for the quantitative determination of total flavonoids in red-stem buckwheat herb (*Fagopyrum rubricaulis*) by spectrophotometry. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(5):565–573. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-689>

Funding. This study was conducted by the grant of the Russian Science Foundation, project No. 24-25-20155.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы внимание исследователей сосредоточено на поиске растений, произрастающих на территории Российской Федерации, которые могут быть источниками для получения биологически активных соединений, в том числе полифенольных соединений. Гречиха красностебельная (*Fagopyrum rubricaulis*) – однолетнее растение, культивируемое на территории Российской Федерации в промышленных масштабах [1, 2], в цветках и листьях которого содержится большое количество флавоноидов [3]. Основным флавоноидом травы гречихи красностебельной является рутин (витамин Р), содержание которого в надземной части растения варьирует от 5,39 до 11,2%, что значительно больше, чем в гречихе посевной (до 4,01%) [4]. В траве гречихи красностебельной также присутствуют кверцетин, изокверцетин, ориентин, витексин и другие флавоноиды [5]. Помимо флавоноидов в надземной части обнаружены фенилпропаноиды (хлорогеновая и кофейная кислоты) и фенолкарбоновые кислоты (протокатеховая, галловая) [6]. Плоды гречихи красностебельной характеризуются высоким содержанием белков, углеводов, жирных и органических кислот [7], витаминами группы В и каротиноидами [8]. Минеральный состав представлен солями кальция, меди, железа, фосфора.

Несмотря на широкий спектр фармакологических эффектов (сырье гречихи красностебельной обладает антимикробными, противовоспалительными, противоаллергическими, антиканцерогенными и антигипертензивными свойствами [9–11], гречиха красностебельная не является фармакопейным растением. Для разработки нормативной документации на растительное сырье «Гречиха красностебельная трава» необходимо определить нормируемые показатели и разработать методы количественного определения биологически активных соединений.

Фармакологическая активность экстрактов гречихи зависит от комплекса флавоноидов: рутин, кверцетин, ориентин, витексин. По данным источников литературы, в настоящее время используют следующие методики количественного определения флавоноидов: спектрофотометрия [12–14], высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым и масс-спектрометрическим-детектированием [15–18], спектроскопия ядерного магнитного резонанса [19, 20]. По данным [21], методики высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием используются для идентификации и количественного определения индивидуальных соединений в сырье и лекарственных растительных препаратах.

Для количественного определения суммы флавоноидов нами была выбрана методика дифференциальной спектрофотометрии как наиболее доступный, быстрый и недорогой метод количественного определения.

Цель работы – разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве гречихи красностебельной с использованием дифференциальной спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служила гречиха красностебельной трава, собранная в фазу массового цветения и начала плодоношения на территории Пензенской обл. в Камешкирском р-не в период с 25 июля по 10 августа 2024 г. Свежесобранную траву гречихи красностебельной сушили в сушильных шкафах (ШС-80-02 СПУ) при температуре не выше 40 °С, измельчение сырья проводили в лабораторных мельницах (ML-08B). Образцы взвешивали на лабораторных аналитических весах (AND GR-120). Определение влажности сырья проводили согласно ОФС.1.5.3.0007 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV изд. Извлечение из травы гречихи красностебельной производили методом мацерации с использованием в качестве экстрагента спирта этилового 40, 70 и 95% при температуре 90 °С. Подтверждение наличия флавоноидов в водно-спиртовых экстрактах осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинках марки «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А-УФ. В качестве стандартного образца (СО) использовали растворы рутина (98,5%, ООО «Геофарма»), кверцетина (98,5%, ООО «Геофарма»), витексина (98%, кат. № 49513, Sigma-Aldrich), изовитексина (98%, кат. № 17804, Sigma-Aldrich), ориентина (97%, кат. № 09765, Sigma-Aldrich), изоориентина (95%, кат. № I1536, Sigma-Aldrich). Элюирование проводили в системе *n*-бутанол (ч.д.а., 99,70%, ООО «НеваРеактив») – ледяная уксусная кислота (х.ч., 99,8%, ООО «Компонент-Реактив») – вода (4:1:2), после полного высушивания детекцию осуществляли в видимом свете; далее при облучении УФ-светом с длинами волн $\lambda=254$ и $\lambda=365$ нм в флуоресцентном аналитическом кабинете УФС-254/365 («Петролазер»). В последующем пластинки обрабатывали 3% спиртовым раствором алюминия хлорида (ч., 98,50%, ACROS).

Для определения количественного содержания суммы флавоноидов в траве гречихи красностебельной использовали метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на батохромном сдвиге спектра поглощения в присутствии раствора алюминия хлорида. К 0,5 мл водно-спиртовых извлечений прибавляли 2 мл раствора алюминия хлорида 3% и несколько капель 30% уксусной кислоты. В качестве раствора сравнения использовали раствор, приготовленный при тех же условиях, но в отсутствие алюминия хлорида. Определение оптической плотности проводили на спектрофотометре СФ-102 (ЗАО «НПКФ Аквилон»). Для расчета суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сырье гречихи красностебельной использовали раствор СО рутина.

Статистическая обработка результатов исследования и валидация методики проведены в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации¹ с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2019.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для качественной идентификации флавоноидов в извлечениях гречихи красностебельной использовали метод тонкослойной хроматографии. В результате проведенного исследования выделены шесть зон (рис. 1), которые имели окраску от светло-желтого до желто-коричневого цвета. Обработка пластины раствором алюминия хлорида 3% повышает селективность проявления флавоноидов при рассмотрении в УФ свете с $\lambda=365$ нм (желтая флуоресценция). Сравнение факторов замедления (R_f) зон флавоноидов на хроматограммах исследуемого и стандартных образцов позволило сделать вывод о наличии в траве гречихи красностебельной рутина, кверцетина, витексина, изовитексина, ориентина и изоориентина.

Спектры поглощения извлечений исследуемого растения имеют максимумы при 352 нм, характерные для веществ флавоноидной природы [22]. Следует отметить, что природа экстрагента не влияла на величину длины волны максимума поглощения. В присутствии алюминия хлорида наблюдался батохромный сдвиг электронного спектра поглощения экстрактов травы гречихи красностебельной с максимумом поглощения, аналогичным раствору СО рутина (410 нм) (рис. 2), поэтому при проведении количественного определения суммы флавоноидов в экстрактах

¹ ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик»; ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний». Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

из травы гречихи красностебельной в качестве стандартного образца нами был выбран рутин.

При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в сырье гречихи красностебельной были определены оптимальные условия проведения экстракции (табл. 1). Учитывая, что увеличение числа операций на стадии пробоподготовки ведет к возрастанию ошибки, выбор сделан в пользу одностадийного процесса экстракции с подтверждением требуемой точности количественного определения.

По результатам проведенных экспериментов разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в сырье гречихи красностебельной. Точную навеску сырья гречихи с влажностью 8%, проходящего через сито с диаметром отверстий 2 мм, массой 1 г помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл и заливали 25 мл спирта этилового 40%. Колбу закрывали пробкой, взвешивали на лабораторных весах с точностью $\pm 0,01$ г, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане 30 мин. Затем колбу охлаждали в течение 30 мин, закрывали той же пробкой, снова взвешивали и восполняли недостающий экстрагент до первоначальной массы колбы. Извлечения фильтровали через бумажный беззольный фильтр (красный) (раствор А).

0,5 мл извлечения (раствора А) количественно переносили в мерную колбу на 50 мл, прибавляли 2 мл раствора алюминия хлорида 3% в спирте этиловом 95% и через 10 мин – 2 капли уксусной кислоты 30%. Объем раствора доводили до метки экстрагентом и оставляли на 30 мин (раствор Б).

0,5 мл извлечения (раствора А) количественно переносили в мерную колбу на 50 мл, прибавляли через 10 мин – 2 капли уксусной кислоты 30%. Объем раствора доводили до метки экстрагентом и оставляли на 30 мин (раствор сравнения).

Измерение оптической плотности раствора Б проводили через 30 мин на спектрофотометре СФ-102 при 410 нм относительно раствора сравнения.

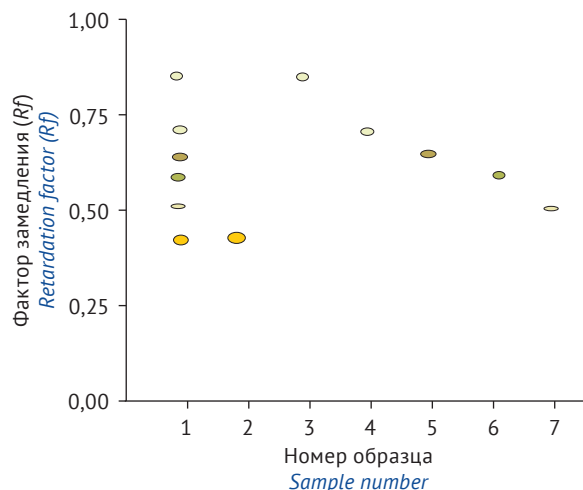


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using his own data

Рис. 1. Хроматограммы образцов: 1 – спиртовое извлечение из травы гречихи красностебельной; растворы стандартных образцов: 2 – рутин 0,05%, 3 – кверцетин 0,05%, 4 – витексин 0,03%, 5 – изовитексин 0,03%, 6 – ориентин 0,03%, 7 – изоориентин 0,03%

Fig. 1. Results of thin-layer chromatography of an ethanol extract of *Fagopyrum rubricaulis* herb (1); 0.05% solutions of reference standards for rutin (2) and quercetin (3); and 0.03% solutions of reference standards for vitexin (4), isovitexin (5), orientin (6), and isoorientin (7)

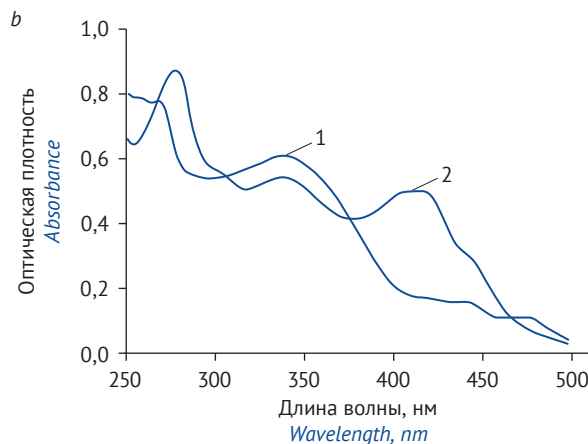
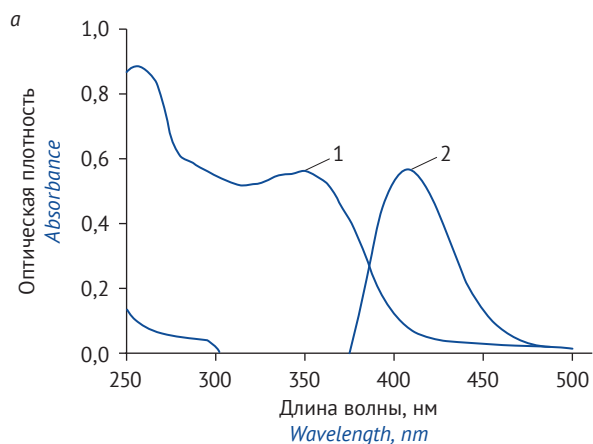


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. УФ-спектры поглощения 40% спиртового извлечения образца гречихи красностебельной (а), спиртового раствора рутина (b) в отсутствие (1) и в присутствии (2) 3% раствора алюминия хлорида

Fig. 2. UV absorption spectra of the 40% ethanol extract of *Fagopyrum rubricaulis* (a) and alcoholic solutions of the reference standard for rutin (b) without (1) and with (2) 3% aluminium chloride

Таблица 1. Показатели экстрагирования суммы флавоноидов из надземной части гречихи красностебельной (n=3)**Table 1.** Extraction parameters for quantifying total flavonoids in the aerial parts of *Fagopyrum rubricaulis* (n=3)

Экстрагент <i>Extraction solvent</i>	Соотношение сырье : экстрагент <i>Sample-to-solvent ratio</i>	Время экстракции, мин <i>Extraction time, min</i>	Степень измельчения не более, мм <i>Fragment size (not more than), mm</i>	Содержание суммы флавоноидов, % <i>Total flavonoid content, %</i>
Степень измельчения <i>Fragment size</i>				
Спирт этиловый 40% <i>Ethanol 40%</i>	1:25	30	1	8,33±0,08
Спирт этиловый 40% <i>Ethanol 40%</i>	1:25	30	2	8,96±0,07
Спирт этиловый 40% <i>Ethanol 40%</i>	1:25	30	5	8,45±0,10
Тип экстрагента <i>Extraction solvent type</i>				
Спирт этиловый 40% <i>Ethanol 40%</i>	1:25	60	2	8,72±0,21
Спирт этиловый 70% <i>Ethanol 70%</i>	1:25	60	2	7,91±0,03
Спирт этиловый 95% <i>Ethanol 95%</i>	1:25	60	2	6,96±0,09
Время экстракции <i>Extraction time</i>				
Спирт этиловый 40% <i>Ethanol 40%</i>	1:25	30	2	10,01±0,12
Спирт этиловый 40% <i>Ethanol 40%</i>	1:25	60	2	8,83±0,14
Спирт этиловый 40% <i>Ethanol 40%</i>	1:25	90	2	9,21±0,11
Спирт этиловый 40% <i>Ethanol 40%</i>	1:25	120	2	9,57±0,21
Сырье : экстрагент <i>Sample-to-solvent ratio</i>				
Спирт этиловый 40% <i>Ethanol 40%</i>	1:25	30	2	9,49±0,09
Спирт этиловый 40% <i>Ethanol 40%</i>	1:50	30	2	5,92±0,18
Спирт этиловый 40% <i>Ethanol 40%</i>	1:100	30	2	3,33±0,23

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. n – число параллельных проб. Полужирным шрифтом выделен наилучший результат.**Note.** n, number of replicates. The best result is highlighted in bold.

Приготовление раствора СО рутина: 20 мг СО с содержанием основного вещества 98,5% помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и растворяли при нагревании на водяной бане в 10 мл спирта этилового 40%, охлаждали, недостающий объем раствора восполняли спиртом этиловым 40% и перемешивали (раствор А СО рутина).

1 мл раствора А СО рутина количественно переносили в мерную колбу на 25 мл, прибавляли

2 мл раствора алюминия хлорида 3% в спирте этиловом 95% и через 10 мин – 2 капли уксусной кислоты 30%. Объем раствора доводили до метки экстрагентом и оставляли на 30 мин (раствор Б).

1 мл раствора А СО рутина количественно переносили в мерную колбу на 25 мл, прибавляли через 10 мин 2 капли уксусной кислоты 30%. Объем раствора доводили до метки экстрагентом и оставляли на 30 мин (раствор сравнения).

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и сухое сырье (X , %) вычисляли по формуле (1):

$$X = \frac{A \times m_0 \times P \times 100 \times 25 \times 1 \times 50 \times 100}{A_0 \times m \times 0,5 \times 25 \times 25 \times (100 - W) \times 100}, \quad (1)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора СО рутин; m_0 – масса СО рутин, г; m – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании, %; P – содержание основного вещества в СО рутин, %.

Проведена метрологическая оценка предложенной методики. В результате пяти параллельных определений ($\bar{X}=9,43$) установлена дисперсия ($S^2=0,03$), стандартное отклонение ($S=0,17$), стандартное отклонение среднего результата ($S_{\bar{X}}=0,07$), относительное стандартное отклонение среднего результата ($RSD=1,8\%$), ширина доверительного интервала ($\Delta\bar{X}=0,21$). Погрешность среднего результата (ϵ , %) суммы флавоноидов с доверительной вероятностью (P , %) 95% в сырье гречихи красностебельной составила $\pm 2,23\%$.

Специфичность методики оценивали по соответствию максимумов поглощения комплексов флавоноидов из травы гречихи красностебельной и раствора стандартного образца рутин с раствором алюминия хлорида 3% (рис. 2). Линейность методики определяли для серии растворов рутин (с концентрацией от 0,002 до 0,012 мг/мл). По полученным данным строили график зависимости значений оптической плотности раствора рутин от концентрации рутин и рассчитывали параметры уравнения линейной регрессии. Коэффициент корреляции составил 0,9967.

Прецизионность методики оценивали путем анализа исследуемого образца гречихи красностебельной в 5-кратной повторности при одинаковых условиях. Согласно полученным результатам среднее значение (\bar{X}) составило 10,08%, стандартное отклонение $S=0,19$, относительное стандартное отклонение среднего результата $RSD=1,88\%$, ширина доверительного интервала $\Delta\bar{X}=0,23$. Погрешность среднего результата (ϵ , %) суммы флавоноидов с доверительной вероятностью (P , %) 95% в сырье гречихи красностебельной составила $\pm 2,28\%$.

Для оценки внутрилабораторной прецизионности количественный анализ спиртового экстракта проводился другим аналитиком в другие дни с использованием того же оборудования

пятикратно. Выявлено, что ошибка среднего результата с доверительной вероятностью 95% составляет не более 3,12% при определении суммы флавоноидов методом спектрофотометрии в пересчете на рутин. Расчетное значение t -критерия Стьюдента $0,01 < 2,306$ (95%; 8); F -критерия Фишера $1,5 < 5,05$. Следовательно, дисперсии результатов анализа обоих химиков статистически эквивалентны и различия между полученными значениями не значимы.

Правильность методики определяли путем рассмотрения результатов изучения линейности валидируемой методики по формуле (2):

$$\Delta b = t(0,05, n-1) \times S_b, \quad (2)$$

где Δb – доверительный интервал свободного члена; $t(0,05; n-1)$ – коэффициент Стьюдента, где 0,05 – уровень значимости; S_b – стандартное отклонение свободного члена.

В результате расчета выявили, что свободный член уравнения (2) меньше доверительного интервала ($0,0227 < 0,25$). Полученные данные свидетельствуют об отсутствии систематической ошибки разработанной нами методики и позволяют рекомендовать ее для количественного определения суммарного содержания флавоноидов в траве гречихи красностебельной в пересчете на рутин.

С помощью разработанной методики были проанализированы четыре образца травы гречихи красностебельной производства ООО «Парафарм». Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин варьировало от $9,15 \pm 0,20$ до $9,55 \pm 0,11\%$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наличие флавоноидов в спиртовом экстракте травы гречихи красностебельной было подтверждено методом тонкослойной хроматографии. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в сырье исследуемого растения методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием стандартного образца рутин при аналитической длине волны 410 нм. Установлены оптимальные параметры экстракции флавоноидов из травы гречихи красностебельной: экстрагент – спирт этиловый 40%, соотношение сырье : экстрагент 1:25 и продолжительность экстракции 30 мин при температуре 90 °С.

На основе результатов валидационной оценки эксперимента можно сделать вывод о возможности использования данной методики для количественного определения содержания

флавоноидов в пересчете на рутин в сырье гречихи красностебельной. Полученные результаты имеют большое значение для дальнейших

исследований гречихи красностебельной в качестве перспективного источника биологически активных соединений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Митишев АВ, Феднина АС, Курдюков ЕЕ, Уланова МИ. Некоторые представители рода *Fagopyrum*: химический состав, фармакологические эффекты, перспективы использования. *Химия растительного сырья*. 2024;(1):31–56. Mitishev AV, Fednina AS, Kurdyukov EE, Ulanova MI. Some species of the genus *Fagopyrum*: Chemical composition, pharmacological effects, prospects of use. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2024;(1):31–56 (In Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.20240112933>
2. Феднина АС, Макарецва МГ, Курдюков ЕЕ, Моисеева ИЯ, Елистратов ДГ, Митишев АВ. Современное состояние исследований химического состава некоторых представителей рода *Fagopyrum*. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2023;26(9):3–11. Fednina AS, Makartseva MG, Kurdyukov EE, Moiseeva IYa, Elistratov DG, Mitishev AV. The current state of research on the chemical composition of some representatives of the genus *Fagopyrum*. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2023;26(9):3–11 (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/25877313-2023-09-04>
3. Магафурова ФФ, Хуснутдинов ВВ. Предварительные результаты селекции на повышение урожайности у гибридных комбинаций гречихи с высоким содержанием рутина. *Вестник КрасГАУ*. 2022;(9):27–32. Magafurova FF, Khusnutdinov VV. Preliminary results of breeding to increase buckwheat hybrid combinations yield with rutin high content. *Bulletin of KrasSAU*. 2022;(9):27–32 (In Russ.). <https://doi.org/10.36718/1819-4036-2022-9-27-32>
4. Borovaya SA, Klykov AG. Some aspects of flavonoid biosynthesis and accumulation in buckwheat plants. *Plant Biotechnol Rep*. 2020;14:213–25. <https://doi.org/10.1007/s11816-020-00614-9>
5. Li J, Yang P, Yang Q. Analysis of flavonoid metabolites in buckwheat leaves using UPLC-ESI-MS/MS. *Molecules*. 2019;24(7):1310. <https://doi.org/10.3390/molecules24071310>
6. Jing R, Li H-Q, Hu C-L, Jiang Y-P, Qin L-P, Zheng C-J. Phytochemical and pharmacological profiles of three *Fagopyrum* buckwheats. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4):589. <https://doi.org/10.3390/ijms17040589>
7. Yilmaz HO, Nurcan YN, Meriç ÇS. Buckwheat: A useful food and its effects on human health. *Curr Nutr Food Sci*. 2020;16(1):29–34. <https://doi.org/10.2174/1573401314666180910140021>
8. Sonam T, Talat A, Sanjay S. An incisive review on buckwheat—A potential underutilized millet. *J Drug Res Ayurvedic Sci*. 2023;8(Suppl 1):64–75. https://doi.org/10.4103/jdras.jdras_214_23
9. Bao T, Wang Y, Sun C. Optimization of flavonoids extraction from Tartary buckwheat rice and analysis of its hypoglycemic activity. *Trans Chin Soc Agricultur Eng*. 2016;32(2):383–9. <https://doi.org/10.11975/j.issn.1002-6819.2016.z2.054>
10. He WP, Li JC, Wang GM. Effect of total flavonoids of buckwheat flower and leaf on myocardial cell apoptosis and Wnt/ β -catenin/PPAR γ pathway in arrhythmic rats. *China J Chinese Materia Medica*. 2023;48:220–5. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20221014.701>
11. Zhong L, Lin Y, Wang C, Niu B, Xu Y, Zhao G, Zhao J. Chemical profile, antimicrobial and antioxidant activity assessment of the crude extract and its main flavonoids from Tartary buckwheat sprouts. *Molecules*. 2022;27(2):374. <https://doi.org/10.3390/molecules27020374>
12. Лабковская МВ, Куркин ВА, Шмыгарева АА, Саньков АН. Разработка методики количественного определения травы астрагала перепончатого *Astragalus membranaceus* L. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2022;21(4):225–9. Lobkovskaya MV, Kurkin VA, Shmygareva AA, Sankov AN. Development of a methodology for the quantitative determination of the herb *Astragalus membranaceus* L. *Bulletin of the Smolensk State Medical Academy*. 2022;21(4):225–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.37903/vsgma.2022.4.31>
13. Калашникова ОА, Рыжов ВМ, Куркин ВА. Методика количественного определения суммы флавоноидов в цветках цефаларии гигантской. *Химия растительного сырья*. 2024;(2):207–15. Kalashnikova OA, Ryzhov VM, Kurkin VA. The method of quantitative determination of the amount of flavonoids in the flowers of giant cephalaria. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2024;(2):207–15 (In Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.20240212969>
14. Куркин ВА, Куркина АВ, Косенко АА. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в почках *Populus alba* L. *Химия растительного сырья*. 2024;(2):168–75. Kurkin VA, Kurkina AV, Kosenko AA. The development of methods for determination the total flavonoids in buds of *Populus alba* L. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2024;(2):168–75 (In Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.20240212904>
15. Lund JA, Brown PN, Shipley PR. Quantification of North American and European *Crataegus* flavonoids by nuclear magnetic resonance spectrometry. *Fitoterapia*. 2020;143:104537. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104537>
16. Лубсандоржиева ПБ, Болданова НБ, Попов ДВ. Количественный анализ флавоноидов в растительном средстве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Сибирский медицинский журнал*. 2013;116(1):114–5. Lubsandorzhieva PB, Boldanova NB, Popov DV. The quantitative analysis of flavonoids in vegetable remedy by HPLC method. *Siberian Medical Journal*. 2013;116(1):114–5 (In Russ.). EDN: RYPDUN
17. Omeje KO, Ezema BO, Onaebi CN. HPLC fingerprint of flavonoids, enzyme inhibition and antioxidant activity of *Newbouldia laevis* stem-bark: An *in vitro* and *in silico* study. *Futur J Pharm Sci*. 2023;9:36. <https://doi.org/10.1186/s43094-023-00486-0>
18. Шевлякова ОА, Ихалайнен АА, Антохин АМ, Таранченко ВФ, Гончаров ВМ, Аксенов АВ и др. Современные способы определения и идентификации флавоноидов горянки (*Epimedium*). *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. 2016;57(3):172–83. EDN: VYVKID Shevlyakova OA, Ikhalaïnen AA, Antokhina AM, Taranenko VF, Goncharov VM, Aksenov AV, et al. Modern approaches for determination and identification of barrenwort (*Epimedium*) flavonoids. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2016;71:182–92. <https://doi.org/10.3103/S0027131416030093>
19. March R, Brodbelt J. Analysis of flavonoids: Tandem mass spectrometry, computational methods, and NMR. *J Mass Spectrom*. 2008;43(12):1581–617. <https://doi.org/10.1002/jms.1480>
20. Куркин ВА, Савельева АЕ, Куркина АВ, Трифонова ПВ. Флавоноиды надземной части бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.). *Химия растительного сырья*. 2023;(3):143–51. Kurkin VA, Saveleva AE, Kurkina AV,

- Trifonova PV. Flavonoids of aerial parts of spreading marigold (*Tagetes patula* L.). *Chemistry of Plant Raw Material*. 2023;(3):143–51 (In Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.20230312189>
21. Рязанова ТК, Куркин ВА. Вопросы использования стандартных образцов при анализе лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов. *Эталон. Стандартные образцы*. 2023;19(2):47–60. Ryazanova TK, Kurkin VA. The use of reference materials in the analysis of medicinal plant raw materials and herbal medicinal products. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(2):47–60 (In Russ.). <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-2-47-60>
22. Куркина АВ. *Флавоноиды фармакопейных растений*. Самара: Офорт; 2012. Kurkina AV. *Flavonoids of pharmacopoeia plants*. Samara: Ofort; 2012 (In Russ.). EDN: [UCPPGGZ](https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-2-47-60)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.В. Митишев – написание текста рукописи, валидация методики, формулировка выводов, статистическая обработка результатов; Е.Е. Курдюков – разработка методики, написание текста рукописи; М.Г. Макарецца – разработка методики; Я.М. Немова – работа с источниками литературы; Д.Г. Елистратов – концепция работы, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; А.С. Паксяев – участие в формулировании выводов, концепция работы.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Alexander V. Mitishev drafted the manuscript, validated the analytical procedure, formulated the conclusions, and performed statistical analysis of the results. Evgeny E. Kurdyukov developed the analytical procedure and drafted the manuscript. Marina G. Makartseva developed the analytical procedure. Yana M. Nemova worked with literature sources. Dmitry G. Elistratov conceptualised the study and approved the final version of the manuscript for publication. Alexey S. Paksyayev formulated the conclusions and conceptualised the study.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Митишев Александр Владимирович / Alexander V. Mitishev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3327-9744>

Курдюков Евгений Евгеньевич, канд. фарм. наук / Evgeny E. Kurdyukov, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9512-6770>

Макарецца Марина Геннадьевна / Marina G. Makartseva

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-9604-4296>

Немова Яна Михайловна / Yana M. Nemova

Елистратов Дмитрий Геннадьевич / Dmitry G. Elistratov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7809-480X>

Паксяев Алексей Сергеевич / Alexey S. Paksyayev

Поступила 05.09.2024

После доработки 03.02.2025

Принята к публикации 11.02.2025

Online first 14.05.2025






Received 5 September 2024

Revised 3 February 2025

Accepted 11 February 2025

Online first 14 May 2025



А.Ю. Фисюк 
О.В. Мушкина 
Н.С. Голяк 
О.А. Ёршик  

Качественный анализ листьев валерианы лекарственной методом тонкослойной хроматографии

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
пр-т Дзержинского, д. 83, стр. 15, г. Минск, 220045, Республика Беларусь

✉ Ёршик Ольга Александровна; org-pharmacei@bsmu.by

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Препараты на основе корневищ и корней валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis* L., сем. *Valerianaceae*) обладают седативным, антиаритмическим, спазмолитическим, противосудорожным, анксиолитическим действием и широко применяются при психоэмоциональных и когнитивных расстройствах, для лечения дисфункций вегетативной нервной системы, в том числе у детей, при климактерических расстройствах. Биологически активные соединения содержатся не только в подземных, но и в надземных органах растения. Это свидетельствует о целесообразности изучения качественного химического состава листьев валерианы лекарственной для оценки возможности использования в медицине, последующей стандартизации и разработки на их основе новых фитопрепаратов.

ЦЕЛЬ. Сравнительный фитохимический анализ биологически активных веществ листьев и корневищ с корнями валерианы лекарственной методом тонкослойной хроматографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Объекты исследования: листья и корневища с корнями валерианы лекарственной, заготовленные в Минской обл. Республики Беларусь в августе 2023 г., высушенные методом воздушно-теневого сушки, измельченные до грубого порошка. Для обнаружения флавоноидов и фенолкарбоновых кислот использовали метод тонкослойной хроматографии на пластинках со слоем силикагеля (Sorbfil ПТСХ-АФ-А). Хроматографирование проводили в следующих подвижных фазах: этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (8:1:1 и 10:2:3), уксусная кислота 2 и 15%; в качестве растворов сравнения использовали 0,020% растворы рутина, кверцетина, хлорогеновой кислоты, кофейной кислоты в 96% этаноле. Для обнаружения сесквитерпеновых кислот хроматографирование осуществляли на пластинках со слоем силикагеля (Merck TLC Silica gel 60 F254) в следующих подвижных фазах: уксусная кислота ледяная – этилацетат – циклогексан (2:38:60), этилацетат – гексан (10:90), ацетон – гексан (1:2), гексан – этилацетат – уксусная кислота ледяная (65:35:0,5). В качестве растворов сравнения использовали 0,025% растворы валереновой кислоты, ацетоксивалереновой кислоты в 96% этаноле.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Подобраны условия проведения тонкослойной хроматографии, позволяющие разделить и идентифицировать химические компоненты листьев валерианы лекарственной, а также проведен сравнительный анализ с биологически активными веществами корневищ с корнями валерианы лекарственной. Установлено, что листья валерианы лекарственной содержат флавоноиды, дубильные вещества и сапонины, корневища с корнями – фенольные соединения, преимущественно дубильные вещества. Наилучшее разделение флавоноидов и фенолкарбоновых кислот достигнуто в системе растворителей «муравьиная кислота безводная – вода – этилацетат» (1:1:8). Установлено, что извлечения из листьев валерианы лекарственной содержат рутин и хлорогеновую кислоту, не содержат кверцетин и кофейную кислоту. Оптимальной подвижной фазой для разделения сесквитерпеновых кислот из листьев валерианы лекарственной является система «уксусная кислота ледяная – этилацетат – циклогексан» (2:38:60).






ВЫВОДЫ. Установлено, что спиртовые извлечения корневищ с корнями и листьев валерианы лекарственной имеют схожий качественный состав флавоноидов, фенолкарбоновых и сесквитерпеновых кислот. Во всех образцах обнаружены рутин, хлорогеновая, валереновая и ацетоксивалереновая кислоты. Необходимо проведение дальнейших исследований для определения количественного содержания этих соединений и оценки целесообразности использования листьев валерианы в качестве источника для получения лекарственных растительных препаратов.

Ключевые слова: валерианы лекарственной листья; *Valeriana officinalis folium*; качественные реакции; тонкослойная хроматография; рутин; флавоноиды; дубильные вещества; сапонины; сесквитерпеновые кислоты; условия хроматографирования; подвижная фаза; стандартизация

Для цитирования: Фисюк А.Ю., Мушкина О.В., Голяк Н.С., Ёршик О.А. Качественный анализ листьев валерианы лекарственной методом тонкослойной хроматографии. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(5):574–582. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-696>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Alexander Yu. Fisiuk 
Olga V. Mushkina 
Natalya S. Golyak 
Olga A. Yorshyk  

Qualitative Analysis of *Valeriana officinalis* leaf by Thin-Layer Chromatography

Belarusian State Medical University,
83/15 Dzerzhinsky Ave, Minsk 220045, Republic of Belarus

✉ Olga A. Yorshyk; org-pharmacei@bsmu.by

ABSTRACT

INTRODUCTION. Drugs based on rhizomes with roots of valerian (*Valeriana officinalis* L., family *Valerianaceae*) have sedative, antiarrhythmic, antispasmodic, anti-convulsant, anxiolytic effects and are widely used in psychoemotional and cognitive disorders, for the treatment of dysfunctions of the autonomic nervous system, including children, and for menopausal disorders. Biologically active compounds are contained not only in the underground, but also in the aboveground organs of the plant. This indicates the expediency of studying the qualitative chemical composition of valerian *officinalis* leaves to assess the possibility of use in medicine, subsequent standardisation and the development of new phytopreparations based on them.

AIM. Comparative phytochemical analysis of biologically active substances of leaves and rhizomes with roots of *Valeriana officinalis* by thin-layer chromatography.

MATERIALS AND METHODS. Objects of research: leaves and rhizomes with roots of valerian harvested in various districts of the Minsk region of the Republic of Belarus in August 2023, dried by air-shade drying, ground to a coarse powder. The method of thin-layer chromatography on plates with a layer of silica gel (Sorbfil PTX-AF-A) was used to detect flavonoids and phenolic carboxylic acids. Chromatography was performed in the following mobile phases: ethyl acetate – formic acid anhydrous – water (8:1:1 and 10:2:3), acetic acid 2 and 15%; 0.020% solutions of rutin, quercetin, chlorogenic acid, and caffeic acid in 96% ethanol were used as comparison solutions. To detect sesquiterpene acids, chromatography was performed on plates with a layer of silica gel (Merck TLC Silica gel 60 F254) in the following mobile phases: glacial acetic acid – ethyl acetate – cyclohexane (2:38:60), ethyl acetate – hexane (10:90), acetone – hexane (1:2), hexane – ethyl acetate-glacial acetic acid (65:35:0.5). 0.025% solutions of valerianic acid and acetoxyvaleric acid in 96% ethanol were used as comparison solutions.

RESULTS. The conditions of thin-layer chromatography have been selected to separate and identify the chemical components of leaves of *Valeriana officinalis*, as well as a comparative analysis with biologically active substances of rhizomes with roots of *V. officinalis*. It was revealed that the leaves of *V. officinalis* contain flavonoids, tannins and saponins, rhizomes with roots contain phenolic compounds, mainly tannins.

The best separation of flavonoids and phenolic carboxylic acids was achieved in the solvent system formic acid anhydrous – water – ethyl acetate (1:1:8). It was found that extracts from the leaves of *V. officinalis* contain rutin and chlorogenic acid, do not contain quercetin and caffeic acid. The optimal mobile phase for the separation of sesquiterpenic acids from valerian leaf is the glacial acetic acid – ethyl acetate – cyclohexane (2:38:60) system.

CONCLUSIONS. It has been established that alcoholic extracts of rhizomes with roots and leaves of valerian have a similar qualitative composition of flavonoids, phenolic carboxylic and sesquiterpenic acids. Rutin, chlorogenic, valerenic, and acetoxyvaleric acids were found in all samples. Thus, *V. officinalis* leaves can serve as a source of flavonoids, phenolic carboxylic and sesquiterpenic acids.

Keywords: valerian leaf; *Valeriana officinalis folium*; qualitative reactions; thin-layer chromatography; rutin; flavonoids; tannins; saponins; sesquiterpenic acids; chromatography conditions; mobile phase; standardization

For citation: Fisiuk A.Yu., Mushkina O.V., Golyak N.S., Yorshyk O.A. Qualitative analysis of *Valeriana officinalis* leaf by thin-layer chromatography. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(5):574–582. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-696>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Валериана лекарственная (*Valeriana officinalis* L., сем. *Valerianaceae*) – лекарственное растение, востребованное в фармацевтическом производстве лекарственных средств и биологически активных добавок к пище [1]. Широко распространена на большей части территории Европы, в том числе по всей территории Республики Беларусь и европейской части России. В диком виде больших зарослей не образует, потребность в лекарственном сырье удовлетворяется главным образом за счет промышленных плантаций [2, 3].

В составе валерианы лекарственной обнаружено более 150 химических соединений: флавоноиды, лигнаны, сесквитерпены (валереновая кислота и ее производные, валеранон, валераналь и кессиловые эфиры), валепотриаты (вальтрат, дидровальтрат, ацевальтрат и изовалероксигидроксивальтрат), дубильные вещества, алкалоиды [4, 5]. В корнях валерианы лекарственной, собранной в Испании, обнаружен гормон фитомелатонин [6]. В листьях и стеблях *Valeriana officinalis* var. *latifolia*, заготовленных в Китае, обнаружены в том числе иридоиды (валерианнолы A-S), алкалоид (5'-изовалерилуридин) [7].

Исследование состава летучих веществ листьев валерианы выявило наличие более 70 компонентов, из них идентифицировано 63: изовалериановая кислота, терпеноиды (эвгенол, линалоол, α -терпинеол, терпинен-4-ол, β -(E)-ионон, миртенол, борнеол, E- β -фарнезен, гермакрен, валерианол, валенсен, валеранон, α - и β -мууролон) и др. Установлено, что на состав и содержание

отдельных соединений оказывает влияние таксономическая принадлежность и места произрастания растений: так, в листьях валерианы, заготовленной в окрестностях г. Запорожья, основными компонентами являются изовалериановая кислота, валеранон, валеренал, валерена-4,7(11)-диен, а в листьях валерианы, заготовленной в окрестностях г. Ярославля, – валерена-4,7(11)-диен, неофитоидиен, валеранон, валеренал, борнилацетат [8, 9].

Препараты из корневищ с корнями валерианы лекарственной широко применяются в неврологии при психоэмоциональных и когнитивных расстройствах, для лечения дисфункций вегетативной нервной системы у детей, при климатических расстройствах, что обусловлено их седативным, антиаритмическим, спазмолитическим и противосудорожным действием [2, 10–13]. Биологически активные вещества (БАВ) корневищ с корнями валерианы лекарственной являются фармакологически активными в отношении коррекции стресса, проявляют анксиолитические свойства [13–15]. Секоиридоиды и 4'-дезоксииридоидный гликозид (валерианол Р, стеноптерин А и патрискабионин С), выделенные из подземных органов растения, проявили антипролиферативную активность в исследовании *in vitro* [7]. Фенольные соединения надземной части растения *Valeriana dioscoridis* обладают антиоксидантной активностью и ингибируют активность ферментов [16]. Для суммы оксикоричных кислот, полученных из травы валерианы лекарственной, была доказана желчегонная активность, а для настойки и гранул травы валерианы – седативное действие [17, 18].

При заготовке корневищ с корнями валерианы лекарственной как дикорастущей, так и с промышленных плантаций трава и листья являются неиспользуемым отходом. Накопление общей биомассы валерианы лекарственной в течение всего вегетационного периода нарастает неравномерно: от фенофазы «3–4 настоящих листа» до фенофазы «прекращение вегетации». Накопление надземной (листовая масса) и подземной (корневища с корнями) биомасс также происходит различными темпами: максимальное значение листовой биомассы в пределах фенологических фаз развития надземной части получено в фенофазу «прикорневой розетки листьев», что позволяет проводить сбор листьев валерианы лекарственной с максимальным выходом биомассы. Корневища с корнями валерианы лекарственной заготавливают в фенофазу «прекращение вегетации», что согласуется с биологическими процессами накопления биомассы растения [19].

При анализе содержания суммы флавоноидов разных серий валерианы лекарственной в различных вегетативных органах выявлено, что содержание флавоноидов в листьях довольно высокое (1,22–3,25%) в сравнении с подземными органами валерианы лекарственной (0,008%). Стебли по содержанию флавоноидов значительно уступают листьям и содержат лишь следовое количество соединений этой группы (значения 0,32–1%), что делает нецелесообразным их присутствие в лекарственном растительном сырье (ЛРС)¹.

Таким образом, листья валерианы лекарственной являются перспективным лекарственным сырьем, содержание флавоноидов в которых превышает таковое в подземных органах растения, а сырьевые запасы достаточны для дополнительного источника данной группы БАВ. Поэтому изучение химического состава листьев валерианы лекарственной с целью стандартизации, возможности использования в медицине и разработки на их основе новых фитопрепаратов является целесообразным.

Корневища с корнями валерианы лекарственной являются фармакопейным сырьем, а препараты на их основе широко применяются в медицине. Сравнение химического состава и фармакологической активности БАВ корневищ с корнями и листьев растения позволит оценить возможность и выявить перспективную область применения препаратов из листьев.

В соответствии с фармакопейным анализом стандартизацию подземных органов валерианы лекарственной проводят методом тонкослойной хроматографии по сесквитерпеновым кислотам (валереновая и ацетокси валереновая). В надземной части также обнаружены флавоноиды, что делает целесообразным проведение стандартизации листьев валерианы лекарственной методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) по сесквитерпеновым кислотам или фенольным соединениям (флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты).

Цель работы – сравнительный фитохимический анализ биологически активных веществ листьев и корневищ с корнями валерианы лекарственной методом тонкослойной хроматографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования: 3 партии листьев и корневищ с корнями валерианы лекарственной (сорт Превосходная), культивируемые в различных районах Минской области Республики Беларусь, заготовленные в августе 2023 г., высушенные методом воздушно-теневого сушки.

Предварительно проводился скрининг биологически активных веществ общепринятыми химическими реакциями на различные классы соединений (дубильные вещества, флавоноиды, сапонины, кумарины, антраценпроизводные, алкалоиды)².

Качественный анализ проводили методом ТСХ, для чего подбирали оптимальные условия экстракции и хроматографирования, позволяющие идентифицировать флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты и сесквитерпеновые кислоты. Извлечения из подземных органов и листьев валерианы лекарственной проводили с использованием различных экстрагентов: для идентификации флавоноидов и фенолкарбоновых кислот применяли воду, спирт этиловый в различных концентрациях, что в соответствии с литературными данными должно обеспечивать извлечение данных групп БАВ [18]. Извлечение сесквитерпеновых кислот проводили в условиях, приведенных в Государственной фармакопее Республики Беларусь (табл. 1).

Для получения извлечений № 1–8 ЛРС, измельченное до грубого порошка с частицами размером 1400 мкм³, помещали в круглодонную

¹ Талашова СВ. Фармакогностическое изучение, стандартизация и комплексная переработка валерианы лекарственной: автореф. ... дис. канд. фарм. наук. М.; 1996.

² Самылина ИА, Яковлев ГП. Фармакогнозия: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.

³ В соответствии с ФС.01/2013:20912 Ситовой анализ (Государственная фармакопея Республики Беларусь. 2 изд. Молодечно; 2012) не менее 97% порошка должно проходить через сито с размером отверстий 1400 мкм.

Таблица 1. Условия получения извлечений из корневищ с корнями и листьев валерианы лекарственной**Table 1.** Conditions for obtaining extracts from rhizomes with roots and leaves of valerian officinalis

№	Орган растения	Экстрагент	Условия экстрагирования
1	Листья	Вода очищенная	Водяная баня 70 °С, 30 мин
2	Листья	30% спирт этиловый	
3	Листья	70% спирт этиловый	
4	Листья	96% спирт этиловый	
5	Корневища с корнями	Вода очищенная	
6	Корневища с корнями	30% спирт этиловый	
7	Корневища с корнями	70% спирт этиловый	
8	Корневища с корнями	96% спирт этиловый	
9	Корневища с корнями	Метанол	Обработка ультразвуком, 10 мин
10	Листья	Метанол	
11	Корневища с корнями	96% спирт этиловый	
12	Листья	96% спирт этиловый	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

колбу со шлифом, прибавляли в соотношении 1 (г) : 20 (мл) различные по природе экстрагенты (табл. 1) и нагревали с обратным холодильником на водяной бане (WB-12, ОДО «Белаквион») при температуре 70 °С в течение 30 мин, затем охлаждали и фильтровали через бумажный складчатый фильтр.

Извлечения № 9–12 получали при обработке 1 г ЛРС, дополнительно измельченного до размера частиц 355 мкм⁴ и суспендированного в 10 мл экстрагента ультразвуком (ультразвуковая баня Nordberg) при частоте 40 кГц в течение 10 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Для обнаружения флавоноидов и фенол-карбоновых кислот в извлечениях № 1–3, 5–7 в качестве неподвижной фазы использовали пластинки со слоем силикагеля (Sorbfil ПТСХ-АФ-А). Хроматографирование проводили в следующих подвижных фазах: этилацетат (х.ч., ООО «Мосреактив») – муравьиная кислота безводная (GR for analysis, Carlo Erba reagents) – вода (8:1:1), этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (10:2:3), уксусная кислота 2% (х.ч., ООО «Мосреактив»), уксусная кислота 15%.

В качестве растворов сравнения использовали 0,020% растворы СО рутина (MedChemExpress, кат. № HY-N0148), кверцетина (MedChemExpress,

кат. № HY-18085), хлорогеновой кислоты (ThermoFisher Scientific, кат. № 10924), кофейной кислоты (MedChemExpress, кат. № HY-N0172) в 96% этаноле.

На стартовую линию хроматографической пластинки наносили по 20 мкл полученных извлечений из корневищ с корнями и из листьев, а также по 5 мкл растворов стандартных образцов (СО). Хроматографировали восходящим способом на высоту 8–10 см в вышеуказанных системах растворителей. Хроматограмму высушивали на воздухе до удаления запаха растворителей, затем пластинку последовательно обрабатывали раствором аминоэтилового эфира дифенилборной кислоты в этаноле и макрогола 400 в этаноле, нагревали при температуре 105 °С в течение 5 мин и просматривали при дневном свете.

Для обнаружения сесквитерпеновых кислот хроматографирование полученных извлечений № 9–12 осуществляли на пластинках со слоем силикагеля (Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄) в следующих подвижных фазах: уксусная кислота ледяная – этилацетат – циклогексан (GR for analysis, Carlo Erba reagents) (2:38:60), этилацетат – гексан (х.ч., ООО «Мосреактив») (10:90)⁵, ацетон (ч.д.а., АО «Новокуйбышевская нефтехимическая компания») – гексан (1:2)⁶, гексан – этилацетат – уксусная кислота ледяная (65:35:0,5)

⁴ ФС.01/2013:20912. Ситовой анализ. Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд. Т. 1. Молодечно; 2012.

⁵ Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд. Т. 2. Молодечно; 2016.

⁶ ФС.2.5.0009.15 Валерианы лекарственной корневища с корнями. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

[21]. В качестве растворов сравнения использовали 0,025% растворы СО валереновой кислоты (ВК) (Carl Roth, кат. № 4488), ацетоксивалереновой кислоты (АВК) (Carl Roth, кат. № 4446) в 96% этаноле.

На стартовую линию хроматографической пластинки наносили по 20 мкл извлечений из корневищ с корнями и листьев, а также по 5 мкл растворов ВК и АВК и хроматографировали восходящим способом на высоту 8–10 см в вышеуказанных системах растворителей. Хроматограмму высушивали на воздухе до удаления запаха растворителей, затем пластинку обрабатывали раствором анисового альдегида⁷, нагревали при температуре 105 °С в течение 5 мин и просматривали при дневном свете.

Для определения валидационной характеристики «специфичность» проводили хроматографирование исследуемых экстрактов и стандартных образцов с использованием метода добавок.

К 1 мл полученных извлечений добавляли 0,1 мл раствора стандартного образца, по 20 мкл полученных растворов наносили на линию старта и хроматографировали в условиях, описанных выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении качественного анализа извлечений (табл. 2) установлено, что листья валерианы лекарственной содержат флавоноиды, дубильные вещества, сапонины. Кумарины, антраценпроизводные и алкалоиды в исследуемых извлечениях обнаружены не были.

При подборе оптимальной подвижной фазы для обнаружения флавоноидов и фенолкарбоновых кислот методом ТСХ было установлено, что наилучшее разделение (наибольшее число зон адсорбции) достигнуто при использовании в качестве подвижной фазы системы, состоящей из этилацетата – муравьиной кислоты

Таблица 2. Результаты проведения качественного химического анализа извлечений из корневищ с корнями и из листьев валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis* L.)

Table 2. Results of biologically active substances qualitative chemical analysis in rhizomes with roots and leaves of *Valeriana officinalis* extracts

Наименование реакции	Результат реакции	Обнаруженная группа биологически активных веществ	Результат в извлечениях	
			Из листьев (№ 1–4)	Из корневищ с корнями (№ 5–8)
С раствором хлорида железа (III)	Красно-коричневое окрашивание	Фенольные соединения	+	–
С раствором хлорида алюминия	Желтое окрашивание раствора, флуоресцирующее в УФ-свете	Флавоноиды	+	–
Цианидиновая проба (проба Шинода)	Оранжево-красное окрашивание	Флавоноиды	+	–
С раствором основного ацетата свинца	Осадок желтого цвета	Фенольные соединения	+	+
С раствором среднего ацетата свинца	Осадок желтого цвета	Фенольные соединения	+	+
С раствором ацетата свинца и уксусной кислотой	Осадок оранжевого цвета	Фенольные соединения	+	+
С раствором желатина	Осадок белого цвета	Дубильные вещества	+	+
Реакция пенообразования	Стойкая пена	Сапонины	+	–
			(щелочная среда)	
Лактонная проба	Отсутствует	Кумарины	–	–
Реакция Борнтрегера	Отсутствует	Антраценпроизводные	–	–
С реактивов Драгендорфа	Отсутствует	Алкалоиды	–	–
С реактивом Вагнера	Отсутствует	Алкалоиды	–	–

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «+» – группа биологически активных веществ обнаружена; «–» – группа биологически активных веществ не обнаружена.

⁷ ОФС.01/2013:40101 Реактивы. Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд. Т. 1. Молодечно; 2012.

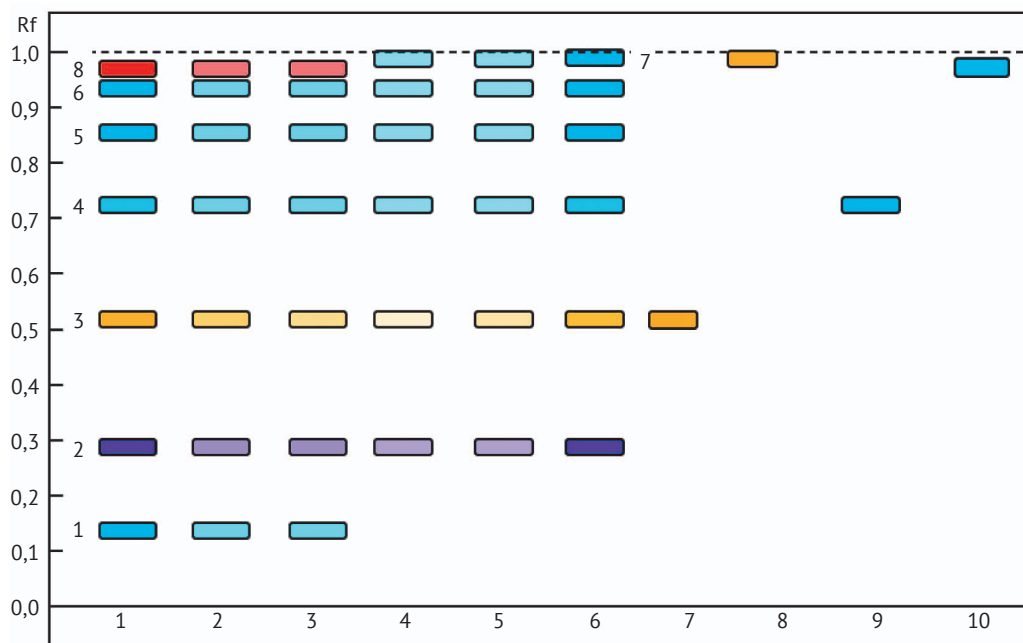


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Схема хроматограммы обнаружения флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в сырье валерианы лекарственной: 1 – извлечение из листьев № 3; 2 – извлечение из листьев № 2; 3 – извлечение из листьев № 1; 4 – извлечение из корневищ с корнями № 5; 5 – извлечение из корневищ с корнями № 6; 6 – извлечение из корневищ с корнями № 7; 7 – раствор рутина; 8 – раствор кверцетина; 9 – раствор хлорогеновой кислоты; 10 – раствор кофейной кислоты

Fig. 1. Schematic chromatogram for flavonoids and phenolcarboxylic acids detection: 1 – leaves extract No. 3; 2 – leaves extract No. 2; 3 – leaves extract No. 1; 4 – rhizomes with roots extract No. 5; 5 – rhizomes with roots extract No. 6; 6 – rhizomes with roots extract No. 7; 7 – rutin standard solution; 8 – quercetin standard solution; 9 – chlorogenic acid standard solution; 10 – caffeic acid standard solution

безводной – воды (8:1:1) (рис. 1). Использование в качестве подвижных фаз растворов уксусной кислоты и смеси этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (10:2:3) не позволило разделить БАВ в исследуемых экстрактах.

На хроматограммах извлечений из листьев обнаружено 7 зон адсорбции различной окраски, а извлечений из корневищ с корнями – 6. Зоны 2–5 присутствовали в извлечениях как из листьев, так и из корневищ с корнями. Зоны 1 и 8 (соответствует хлорофиллу) обнаруживались только в извлечениях из листьев, а зона 7 – из корневищ с корнями. Интенсивность окраски зон увеличивалась с ростом концентрации экстрагента (этилового спирта). Зона 3 по значению коэффициента удерживания (Rf) и окраске соответствовала зоне СО рутина, а зона 4 – хлорогеновой кислоте. Зоны, соответствующие стандартным образцам кверцетина (зона оранжевого цвета) и кофейной кислоты (зона голубого цвета), имели значение Rf, близкое к 1, и не обнаруживались в исследуемых извлечениях. Следовательно, можно сделать вывод, что в листьях валерианы лекарственной содержатся рутин и хлорогеновая кислота, а кверцетин и кофейная кислота не найдены.

При сравнительном анализе водного и водно-спиртовых извлечений из листьев и корневищ с корнями валерианы выявлено одинаковое количество зон адсорбции.

При подборе оптимальной подвижной фазы для обнаружения сесквитерпеновых кислот было установлено, что наилучшее разделение (число и окраска зон адсорбции) достигнуто при использовании в качестве подвижной фазы системы, состоящей из уксусной кислоты ледяной – этилацетата – циклогексана (2:38:60) (рис. 2). Использование в качестве подвижной фазы смеси ацетон – гексан (1:2) позволило обнаружить до 10 зон адсорбции. Другие подвижные системы позволили обнаружить не более 5 зон адсорбции без их четкого разделения и при отсутствии границ между зонами адсорбции, в связи с чем использование таких подвижных фаз нецелесообразно.

При сравнении хроматограмм метанольных и этанольных извлечений не было обнаружено отличий, в связи с чем для извлечения сесквитерпеновых кислот рекомендуется использовать менее токсичный экстрагент – 96% этанол. В этанольных извлечениях из листьев

и корневищ с корнями валерианы лекарственной идентифицированы ВК и АВК.

На хроматограмме листьев обнаруживаются 13 пятен различной окраски (от зеленой до темно-сине-фиолетовой), на хроматограмме корневищ с корнями обнаруживаются 12 зон адсорбции. 7 зон адсорбции со значениями R_f 0,85; 0,77; 0,72; 0,60; 0,56; 0,49; 0,46 обнаруживаются на хроматограмме как листьев, так и корневищ с корнями. При этом зоны со значениями R_f 0,72 и 0,60 соответствуют СО валереновой и ацетоксивалереновой кислот соответственно.

ТСХ-анализ флавоноидов, фенолкарбоновых и сесквитерпеновых кислот в предложенных условиях может использоваться для стандартизации и оценки качества нового ЛРС – листьев валерианы, содержащих флавоноиды (рутин), фенолкарбоновые кислоты (хлорогеновая кислота), сесквитерпеновые кислоты (ВК и АВК).

ВЫВОДЫ

1. С помощью качественных реакций выявлено, что водные, водно-спиртовые и спиртовые извлечения валерианы лекарственной содержат флавоноиды, дубильные вещества и сапонины.
2. Методом тонкослойной хроматографии показано наличие валереновой, ацетоксивалереновой и хлорогеновой кислот, рутина как в листьях, так и в корневищах с корнями.
3. Листья валерианы лекарственной содержат флавоноиды (рутин), фенолкарбоновые кислоты (хлорогеновая кислота), сесквитерпеновые кислоты (валереновая и ацетоксивалереновая

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Маевский ПФ. *Флора средней полосы европейской части России*. М.: Товарищество научных изданий КМК; 2014. Maevsky PF. *Flora of the middle zone of the European part of Russia*. Moscow: Association of Scientific Publications KMK; 2014 (In Russ.). EDN: [QJDEED](#)
2. Дадаев ХА, Акилов ДХ, Тогаев МК. Валериана лекарственная. *Биология и интегративная медицина*. 2021;(1):233–49. Dadaev KhA, Akilov DKh, Togaev MK. Valeriana officinalis. *Biology and Integrative Medicine*. 2021;(1):233–49 (In Russ.). EDN: [AUPAEY](#)
3. Черноокая КА, Петровец МИ, Прихач ТР. Адаптивная технология выращивания валерианы лекарственной в агрозоных условиях Беларуси. В кн.: Климук ВВ, ред. *Техника и технологии: инновации и качество*. Барановичи; 2017. С. 172–3. Chernookaya KA, Petrovets MI, Prikhach TR. Adaptive technology for growing valerian officinalis in agrozoal conditions of Belarus. Klimuk VV, ed. *Engineering and technology: Innovation and quality*. Baranovich; 2017. P. 172–3 (In Russ.).
4. Погочкая АА, Погочкий АК. Валериана форте – седативное средство растительного происхождения. *Рецепт*. 2014;(2):150–4. Pogotskaya AA, Pogotsky AK. Valerian forte – a sedative of plant origin. *Prescription*. 2014;(2):150–4 (In Russ.). EDN: [RZPXZT](#)
5. Nandhini S, Narayanan KB, Ilango K. Valeriana officinalis: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Asian J Pharm Clin Res*. 2018;11(1):36–41. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i1.22588>
6. Losada M, Cano A, Hernandez-Ruiz J, Arnao MB. Phytomelatonin content in Valeriana officinalis L. and some related phytotherapeutic supplements. *Int J Plant Based Pharm*. 2022;2(2):176–81. <https://doi.org/10.55484/ijpbp.1079005>
7. Liu JJ, Wang LZ, Duan YT, Liu D, Li HM, Li RT. New iridoids and acyclic monoterpenoids from the roots and rhizomes of Valeriana officinalis var. latifolia. *Chem Biodivers*. 2024; 21(2):e202301949. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202301949>
8. Liu JJ, Hao JJ, Tan M, Liao CC, Liu D, Li HM, Li RT. Iridoids and other constituents from the leaves and stems of Valeriana officinalis var. latifolia. *Phytochemistry*. 2024;218:113934. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2023.113934>
9. Шкроботько ПЮ, Ткачѳв АВ, Юсубов МС, Белоусов МВ, Фурса НС. Валериана лекарственная: компонентный состав летучих веществ листьев в окрестностях г. Ярославля и в окрестностях г. Запорожья. *Российский*

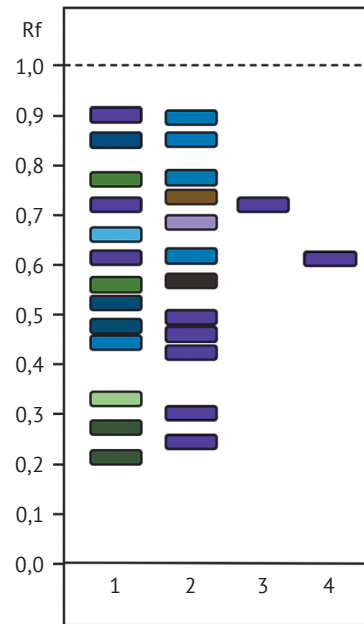


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Схема хроматограммы обнаружения сесквитерпеновых кислот в сырье валерианы лекарственной: 1 – извлечение из листьев № 12; 2 – извлечение из корневищ с корнями № 11; 3 – раствор валереновой кислоты; 4 – раствор ацетоксивалереновой кислоты

Fig. 2. Schematic chromatogram for sesquiterpene acids detection No. 11; 3 – valerenic acid standard solution; 4 – acetoxivalerenic acid standard solution

кислоты). Необходимо проведение дальнейших исследований для определения количественного содержания этих БАВ и оценки целесообразности использования листьев валерианы в качестве источника для получения лекарственных растительных препаратов.

- медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. 2010;18(2):141–50. Shkrobotko PYu, Tkachev AV, Jusubov MS, Belousov MV, Fursa NS. Valerian officinalis: component composition of volatile substances of leaves in the vicinity of Yaroslavl and in the vicinity of Zaporozhye. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2010;18(2):141–50 (In Russ.). EDN: NUUJLP
10. Хишова ОМ. Фармакологическое действие валерианы лекарственной и создание препаратов на ее основе. *Вестник фармации*. 2001;(3–4):43–7. Khishova OM. Pharmacological action of *Valeriana officinalis* and the creation of drugs based on it. *Bulletin of Pharmacy*. 2001;(3–4):43–7 (In Russ.).
 11. Li J, Li X, Wang C, Zhang M, Ye M, Wang Q. The potential of Valeriana as a traditional Chinese medicine: traditional clinical applications, bioactivities, and phytochemistry. *Front Pharmacol*. 2022;13:973138. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.973138>
 12. Rezvani ME, Roohbakhsh A, Allahtavakoli M, Shamsizadeh A. Anticonvulsant effect of aqueous extract of *Valeriana officinalis* in amygdala-kindled rats: possible involvement of adenosine. *J Ethnopharmacol*. 2010;127(2):313–8. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.11.002>
 13. Mirabi P, Mojab F. The effects of valerian root on hot flashes in menopausal women. *Iran J Pharm Res*. 2013;12(1):217–22. PMID: PMC3813196
 14. Jung HY, Yoo DY, Nam SM, Kim JW, Choi JH, Yoo M, et al. Valerianic acid protects against physical and psychological stress by reducing the turnover of serotonin and norepinephrine in mouse hippocampus-amygdala region. *J Med Food*. 2015;18(12):1333–9. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.3412>
 15. Becker A, Felgentreff F, Schröder H, Meier B, Brattstrom A. The anxiolytic effects of a valerian extract is based on valerianic acid. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:267. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-267>
 16. Sarikurkcuca C, Jeszka-Skowronb M, Sabih Ozer M. Valeriana dioscoridis aerial parts' extracts – A new source of phytochemicals with antioxidant and enzyme inhibitory activities. *Ind Crop Prod*. 2020;148:112273. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112273>
 17. Талашова СВ, Фурса НС, Литвиненко ВИ, Попова ТП, Аммосов АС, Дегай АМ. Способ получения суммы оксикоричных кислот, обладающей желчегонным действием. Патент Российской Федерации № 2106876 С1; 1995. Talashova SV, Fursa NS, Litvinenko VI, Popova TP, Ammosov AS, Degaj AM. Method for obtaining totality of hydroxy-cinnamic acids producing cholagogic effect. Patent of Russian Federation No. 2106876 C1; 1995 (In Russ.). EDN: SIXDHL
 18. Талашова СВ, Фурса НС, Литвиненко ВИ, Попова ТП, Аммосов АС, Дегай АМ. Способ получения экстракта валерианы, обладающего седативным действием. Патент Российской Федерации № 2098115 С1; 1995. Talashova SV, Fursa NS, Litvinenko VI, Popova TP, Ammosov AS, Degaj AM. Method of preparing valerian extract showing sedative effect Patent of Russian Federation No. 2098115 C1; 1995 (In Russ.).
 19. Регилевич АА, Ничипорук АГ. Динамика накопления биомассы валерианы лекарственной. *Агрономия, защита растений, зоотехния, ветеринария*. 2012;(1):81–2. Regilevich AA, Nichiporuk AG. Dynamics of biomass accumulation of *Valeriana officinalis*. *Agronomy, Plant Protection, Animal Science, Veterinary Medicine*. 2012;(1):81–2 (In Russ.).
 20. Лукашов РИ. Влияние природы и концентрации экстрагентов на извлечение флавоноидов из травы золотарника канадского. *Химия растительного сырья*. 2018;(4):113–23. Lukashov RI. Influence of the nature and concentration of extractants on the extraction of flavonoids from the Canadian goldenrod herb. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2018;(4):113–23 (In Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcpr.2018043863>
 21. Nagara ZZ, Saour KY. Phytochemical and pharmacological study of valepotriates in *Valeriana officinalis* L. F. Valerianaceae cultivated in Iraq. *Iraqi J Pharm Sci*. 2015;24(1):1. <https://doi.org/10.31351/vol24iss1pp1-10>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.Ю. Фисиук – работа с источниками литературы, проведение эксперимента, формулировка выводов, написание текста рукописи; О.В. Мушкина – концепция работы, постановка задачи; О.А. Ёршик – участие в формулировании выводов, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; Н.С. Голяк – концепция исследования.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Alexander Yu. Fisiuk – work with literature sources, conducting an experiment, formulating conclusions, writing the text of the manuscript. Olga V. Mushkina – concept of work, statement of the problem. Olga A. Yorshyk – participation in the formulation of conclusions, approval of the final version of the manuscript for publication. Natalya S. Golyak – concept of research.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Фисиук Александр Юрьевич / Alexander Yu. Fisiuk

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-6220-514X>

Мушкина Ольга Владимировна, канд. фарм. наук, доцент / **Olga V. Mushkina**, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3397-1220>

Голяк Наталья Степановна, канд. фарм. наук, доцент / **Natalya S. Golyak**, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4904-6523>

Ёршик Ольга Александровна, канд. фарм. наук, доцент / **Olga A. Yorshyk**, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-9977-7464>

Поступила 17.09.2024

После доработки 24.04.2025

Принята к публикации 25.04.2025

Online first 06.06.2025





Received 17 September 2024

Revised 24 April 2025

Accepted 25 April 2025

Online first 6 June 2025



М.В. Рощина 
Н.Г. Сахно 
О.В. Гунар  

Контроль стерильности высокотехнологичных лекарственных препаратов: влияние питательной среды, времени анализа и количества образца

*Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация*

✉ **Гунар Ольга Викторовна**; gunar@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Контроль стерильности высокотехнологичных лекарственных препаратов (ВТЛП) осложнен рядом факторов, в том числе: ограничением объема доступной пробы, чувствительностью препаратов к условиям тестирования, ограничением срока хранения препаратов. Контроль классическими фармакопейными методами зачастую не позволяет своевременно и достоверно подтвердить стерильность ВТЛП, что снижает доступность препаратов для пациентов и возможность быстрого проведения необходимой терапии. Повысить скорость и эффективность проведения контроля стерильности можно путем разработки альтернативных ускоренных микробиологических методик, учитывающих специфику ВТЛП.

ЦЕЛЬ. Оптимизация методики контроля стерильности высокотехнологичных лекарственных препаратов методом колориметрического определения углекислого газа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Объект исследования – образец высокотехнологичного лекарственного генотерапевтического препарата. Используемые тест-штампы: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) NCTC 737, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* ВКПМ F-62, *Aspergillus terreus* ВКПМ F-1269, *Penicillium chrysogenum* ВКПМ F-3. Питательные среды: SA, SN и iLYM для прибора VacT/ALERT 3D Dual T – флаконы с модифицированными средами на основе триптиказо-соевого бульона; триптиказо-соевый бульон (TSB) и жидкая тиогликолевая среда (FTM) – пробирки с фармакопейными питательными средами, предусмотренными для проведения испытания по показателю «Стерильность» методом прямого посева. Оборудование: ламинарный шкаф Purifier Logic A2, система VacT/ALERT 3D Dual T с автоматическим мониторингом и детекцией контаминированных флаконов и построением кривых роста микроорганизмов. Контаминированные образцы ВТЛП готовили с теоретической концентрацией тест-штаммов 3 КОЕ/мл. Посев осуществляли в объемах 0,1; 0,5 и 1,0 мл в двадцатикратной повторности в пробирки и флаконы с соответствующими питательными средами. Использовали как фармакопейные среды (TSB, FTM), так и модифицированные, предназначенные для системы VacT/ALERT (SA, SN, iLYM). Инкубацию при прямом посеве проводили в течение 14 сут; анализ в системе VacT/ALERT длился 7 сут при непрерывном автоматическом мониторинге при температурах 32,5±2,5 и 22,5±2,5 °C для бактерий и грибов соответственно. Результаты учитывали визуально (прямой посев) и по кривым роста содержания CO₂ (альтернативный метод).

РЕЗУЛЬТАТЫ. В ходе исследования установлено, что чувствительность VacT/ALERT 3D Dual T при анализе проб объемом 0,5 мл составила ≥80% для аэробных и анаэробных бактерий, а также ≥90% для дрожжевых и плесневых грибов при использовании модифицированной среды iLYM с предварительной

аэрацией. В условиях прямого посева тот же уровень выявления требовал не менее 1,0 мл пробы. Сроки выявления контаминации с использованием ВаСТ/ALERT были на 0,38–2,4 сут меньше, чем при фармакопейной методике прямого посева, при сохранении полноты обнаружения всех тест-штаммов, за исключением *Candida albicans*, время детектирования которого одинаково при использовании обеих методик. Частота получения ложноотрицательных результатов при выявлении плесневых грибов на среде SA достигала 13–70% в зависимости от штамма. Введение этапа кратковременной аэрации (5–7 с) при использовании среды iLYM снижало частоту ложноотрицательных результатов до 0–3%. Все тестируемые микроорганизмы, кроме *Cutibacterium acnes*, были полностью детектированы в течение ≤ 28 ч; для *C. acnes* время инкубации составило около 134 ч.





ВЫВОДЫ. Альтернативный метод ВаСТ/ALERT 3D Dual Т превосходит традиционную фармакопейную методику по чувствительности, воспроизводимости и скорости анализа. Ложноотрицательные результаты при выявлении плесневых грибов на среде SA достигали 70%, но показана возможность их практически полного устранения при использовании аэрированной среды iLYM. Полный спектр тест-микроорганизмов достоверно выявляется за 7 сут обеими методиками, при этом время обнаружения контаминации с использованием альтернативной методики снижается на 0,38–2,4 сут. Объем пробы 0,5 мл в системе ВаСТ/ALERT обеспечивает эффективное выявление контаминантов, что вдвое снижает расход ВТЛП по сравнению с фармакопейным методом (1,0 мл).

Ключевые слова: высокотехнологичные лекарственные препараты; контроль стерильности; альтернативные микробиологические методы; ВаСТ/ALERT

Для цитирования: Рощина М.В., Сахно Н.Г., Гунар О.В. Контроль стерильности высокотехнологичных лекарственных препаратов: влияние питательной среды, времени анализа и количества образца. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(5):583–594. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-5-583-594>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200093-9).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Marina V. Roshchina 
Nadezhda G. Sakhno 
Olga V. Gunar  

Sterility Control of Advanced Therapy Medicinal Products: Impact of Growth Medium, Analysis Time, and Sample Quantity

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Olga V. Gunar; gunar@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Sterility testing of advanced therapy medicinal products (ATMP) implies several challenges, including limited volume of available sample, product sensitivity to test conditions, and short shelf life. Classical pharmacopoeial test methods often fail to confirm sterility in a timely and reliable manner. The resulting drug availability for patients is reduced, as well as the opportunity for fast treatment with high-quality medicines. Faster alternative microbiological methods that reflect ATMP specificity of advanced therapy medicinal products can speed up and enhance sterility control.

AIM. This study aimed to optimise ATMP sterility control using colorimetric carbon dioxide detection.

MATERIALS AND METHODS. We used an experimental sample of an ATMP as the test object. We challenged the system with the following test strains: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium*

acnes) NCTC 737, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* VKPM F-62, *Aspergillus terreus* VKPM F-1269, *Penicillium chrysogenum* VKPM F-3. We used SA, SN, and iLYM bottles with pharmacopoeial growth media: modified tryptic soy broth for the BacT/ALERT 3D Dual T system, tryptic soy broth, and fluid thioglycollate medium in test tubes designed for sterility testing using direct inoculation. All manipulations took place in a Purifier Logic A2 laminar flow cabinet, with BacT/ALERT 3D Dual T system to automatically monitor cultures, detect contamination, and record microbial growth curves. We prepared artificially contaminated samples by adding 3 CFU/mL of each test strain. We inoculated 0.1, 0.5, and 1.0 mL sample volumes into appropriate media, performing 20 replicates for each condition. Growth media included both pharmacopoeial (tryptic soy broth, fluid thioglycollate) ones and modified media for BacT/ALERT (SA, SN, iLYM). We incubated the direct inoculation samples for 14 days. In the BacT/ALERT system, we ran a 7-day incubation with continuous monitoring at 32.5±2.5 °C for bacteria and 22.5±2.5 °C for fungi. We evaluated direct inoculation results visually and assessed BacT/ALERT results based on CO₂ growth curves (alternative method).

RESULTS. The BacT/ALERT 3D Dual T system detected ≥80% of aerobic and anaerobic bacteria and ≥90 % of yeasts and molds at 0.5 mL sample volume using pre-aerated iLYM medium. In contrast, direct inoculation required 1.0 mL to reach similar detection levels. BacT/ALERT reduced the time to contamination detection by 0.38–2.4 days compared to direct inoculation, while identifying all test strains except *Candida albicans* that showed similar detectability in both methods. When using SA medium, false-negative results for molds made 13–70 % of cases, depending on the strain. Short-time iLYM aerating for 5–7 s before incubation reduced false negatives to 0–3 %. We successfully detected all tested microorganisms within 28 h, except for *Cutibacterium acnes*, which required up to 134 h.

CONCLUSIONS. The BacT/ALERT 3D Dual T system delivers higher sensitivity, reproducibility, and faster detection compared to traditional pharmacopoeial methods. False negative results for mold fungi in SA medium were as high as 70%. However, they can be significantly reduced using aerated iLYM medium. Both methods reliably detect all test organisms within 7 days, but alternative BacT/ALERT achieves detection 0.38–2.4 days sooner. Using a 0.5 mL sample volume with BacT/ALERT effectively detects contamination and reduces product use by half compared to pharmacopoeial testing (1.0 mL).

Keywords: advanced therapy medicinal products; ATMP; sterility testing; alternative microbiological methods; BacT/ALERT

For citation: Roshchina M.V., Sakhno N.G., Gunar O.V. Sterility control of advanced therapy medicinal products: Impact of growth medium, analysis time, and sample quantity. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(5):583–594. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-5-583-594>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of State Assignment No. 056-00001-25-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D Registry No. 124022200093-9).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка высокотехнологичных лекарственных препаратов (ВТЛП) сопряжена с применением сложных биоинженерных платформ, включая гены и клеточные системы, моноклональные антитела, использование РНК-интерференционных подходов, рекомбинантные технологии и нанотехнологии, что принципиально отличает данный класс препаратов от традиционных лекарственных препаратов [1].

ВТЛП характеризуются выраженной биологической активностью, имеют сложную структуру, как правило, неустойчивы к физико-химическим

воздействиям. Эти особенности определяют повышенные требования к качеству ВТЛП. Одним из критически значимых параметров является их стерильность, поскольку наличие даже единичных микроорганизмов может повлечь тяжелые последствия для пациента, особенно в условиях парентерального введения, иммуносупрессии или иммунодефицита – состояниях, при которых часто используются ВТЛП [2].

Контроль стерильности ВТЛП может быть сопряжен с рядом методологических трудностей. Компоненты препаратов (стабилизаторы, антибиотики, сурфактанты, консерванты

и другие вспомогательные вещества) могут проявлять выраженное ингибирующее действие на рост микроорганизмов, детектируемых стандартными методиками контроля стерильности, что приводит к получению ложноотрицательных результатов и снижению достоверности контроля [3]. При использовании метода мембранной фильтрации возможна закупорка пор мембран и нарушение фильтрации в целом из-за высокой вязкости препарата, пенообразования, наличия белковых агрегатов. Кроме того, ВТЛП могут быть контаминированы специфическими микроорганизмами, что вызовет необходимость коррекции условий инкубации.

Состав ВТЛП (живые клетки, рекомбинантные белки, генно-инженерные конструкции и другие потенциально нестабильные компоненты) определяет ограничение срока их хранения¹. Это, в свою очередь, требует сокращения времени проведения обязательных испытаний качества, в том числе подтверждения стерильности. Однако классическая фармакопейная методика, основанная на фиксации роста микроорганизмов, предусматривает инкубацию образцов не менее 14 сут [4], что делает невозможным быстрое принятие решений о выпуске серии и требует совершенствования подходов.

ВТЛП могут использоваться в рамках персонализированной терапии как препараты, предназначенные для индивидуального применения, в малых объемах [5]. Это означает, что количество доступного для испытаний материала строго ограничено, а потеря даже небольшого объема может критично сказаться на обеспечении пациента необходимой терапией².

Одним из возможных решений описанных проблем является разработка альтернативных микробиологических методов, учитывающих специфику ВТЛП, позволяющих сократить сроки анализа по показателю «Стерильность», снизить необходимый объем исследуемой пробы и при этом сохранить высокую чувствительность и надежность микробиологического контроля³.

Цель работы — оптимизация методики контроля стерильности высокотехнологичных лекарственных препаратов методом колориметрического определения углекислого газа.

Задачами исследования являются:

- анализ данных научной литературы, фармакопейной и нормативной документации для оценки перспективности применения альтернативного микробиологического метода колориметрического определения углекислого газа в питательной среде для контроля стерильности ВТЛП;
- сравнительный анализ питательных сред и оценка вероятности возникновения ложноотрицательных результатов, с особым вниманием к возможности выявления контаминации ВТЛП плесневыми грибами;
- определение сроков инкубации, необходимых для обнаружения микробной контаминации ВТЛП;
- определение минимального объема образца, достаточного для достоверной детекции контаминантов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В качестве объекта исследования был использован экспериментальный образец генотерапевтического ВТЛП. Тест-штаммы микроорганизмов и условия инкубации приведены в таблице 1.

Питательные среды:

- SA, SN и iLYM (bioMerieux SA, Франция, кат. № 259789; 259790; 259788) — флаконы с модифицированными средами на основе триптиказо-соевого бульона для прибора BacT/ALERT 3D Dual T (bioMerieux SA, Франция);
- триптиказо-соевый бульон (Tryptic Soy Broth, TSB, bioMerieux SA, Франция, кат. № 42100) и жидкая тиогликолевая среда (Fluid Thioglycollate Medium, FTM, bioMerieux SA, Франция, кат. № 42018) — пробирки с фармакопейными питательными средами, предусмотренными для проведения испытания по показателю «Стерильность» методом прямого посева⁴.

Методы. В соответствии с требованиями Европейской фармакопеи и Фармакопеи США⁵ при контроле стерильности ВТЛП наряду с классическими методами — прямым посевом и мембранной фильтрацией — допускается применение альтернативных методик, включая автоматизированные системы, обеспечивающие

¹ 2.6.27. Microbiological examination of cell-based preparations. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021.

² Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

³ 2.6.27. Microbiological examination of cell-based preparations. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021.

⁴ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁵ 2.6.27. Microbiological examination of cell-based preparations. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021. <1046> Cell-based advanced therapies and tissue-based products. United State Pharmacopoeia. 47–NF42. 2024.

Таблица 1. Условия методик контроля стерильности образцов

Table 1. Test conditions of sample sterility

Название микроорганизма, номер штамма <i>Microorganism, strain number</i>	Питательные среды <i>Nutrient media</i>	Температура инкубации, °С <i>Incubation temperature, °C</i>
Аэробные бактерии <i>Aerobic bacteria</i>		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	SA, FTM	32,5±2,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538		
Анаэробные бактерии <i>Anaerobic bacteria</i>		
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	SN, FTM	32,5±2,5
<i>Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes)</i> NCTC 737		
Дрожжевые грибы <i>Yeast</i>		
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	iLYM, TSB	22,5±2,5
Плесневые грибы <i>Mold</i>		
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	iLYM, SA, TSB	22,5±2,5
<i>Aspergillus fumigatus</i> ВКПМ F-62		
<i>Aspergillus terreus</i> ВКПМ F-1269		
<i>Penicillium chrysogenum</i> ВКПМ F-3		

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

эквивалентную чувствительность и воспроизводимость. В настоящее время не существует универсального альтернативного подхода к оценке стерильности лекарственных средств, что обуславливает необходимость подбора альтернативного микробиологического метода с учетом специфики каждого анализируемого препарата⁶. При выборе метода учитывают физико-химические свойства исследуемого образца, возможность фильтрации, наличие антимикробного действия, а также другие свойства препарата, способные повлиять на достоверность и воспроизводимость результатов.

Проведена сравнительная оценка методов, применимых для контроля стерильности ВТЛП: классического фармакопейного метода прямого посева и альтернативной методики, основанной на колориметрическом определении углекислого газа (CO₂), продуцируемого в процессе микробного метаболизма [6].

Культуры микроорганизмов, инкубированные в течение 24 ч на скошенных агаризованных питательных средах, смывали стерильным 0,9% раствором натрия хлорида. Полученные

суспензии стандартизировали с использованием международного стандарта мутности ВОЗ 10 МЕ. В работе использовали суспензии конидий плесневых грибов и спор *Bacillus subtilis* с заранее установленной концентрацией клеток.

Путем последовательных разведений получали взвеси тест-штаммов с теоретической концентрацией 30 КОЕ/мл. Фактическое содержание клеток в суспензии подтверждали путем поверхностного посева на соответствующие агаризованные питательные среды (триптиказо-соевый агар и агар Сабуро с декстрозой и хлорамфениколом, HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия, кат. № M290-500G, M1067-500G). Отклонение фактического значения от теоретического составляло не более 8,3%.

При подтверждении оптимального количества ВТЛП и времени инкубации посевов для анализа стерильности в асептических условиях ламинарного шкафа Purifier Logic A2 (Labconco, США) в пробирки и флаконы с подходящими питательными средами вносили в двадцатикратной повторности по 0,1; 0,5 и 1,0 мл контаминированных тест-штаммами образцов ВТЛП, при этом концентрация клеток составляла ~3 КОЕ/мл.

⁶ 5.1.6. Alternative methods for control of microbiological quality. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021. <1223> Validation of alternative microbiological methods. United State Pharmacopoeia. 47–NF42. 2024.

На данном этапе исследования использовали 5 видов аэробных и анаэробных бактерий (*B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. sporogenes*, *C. acnes*) и 2 вида дрожжевых и плесневых грибов (*C. albicans*, *A. brasiliensis*). Пробирки инкубировали в термостатах в течение 14 сут. Инокулированные флаконы помещали в инкубационный модуль прибора BacT/ALERT 3D Dual T и культивировали 7 сут. Наблюдение и учет результатов проводили ежедневно, просматривая пробирки в проходящем свете. При наличии помутнения питательной среды, образования пленки или появлении осадка фиксировали наличие роста микроорганизмов. Автоматический мониторинг с детекцией контаминированных флаконов и построением кривых роста микроорганизмов проводили с использованием системы BacT/ALERT 3D Dual T.

Правильность методики оценивали как долю обнаружения контаминированных образцов (K, %), выраженную в виде отношения числа положительных проб к истинному (фактическому) количеству инокулированных образцов. Правильность методики считали приемлемой, если доля обнаружения контаминированных образцов составляла не менее 70% от установленного фактического значения⁷.

Оценка и интерпретация ключевых валидационных характеристик методики, включая предел обнаружения (LOD_{50}), правильность и прецизионность, отражающих возможность детектировать микроорганизмы с уровнем чувствительности и воспроизводимости, не уступающим фармакопейному методу прямого посева, были описаны ранее [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Применимость метода контроля стерильности лекарственных препаратов путем колориметрического определения CO_2 . Альтернативный метод определения стерильности представляет собой микробиологическую методику, предназначенную для выявления контаминантной микрофлоры в различных типах лекарственных препаратов, отличающуюся от классического фармакопейного подхода по ряду технологических и методологических параметров — включая способ проведения анализа, тип применяемого оборудования, используемые питательные среды, а также продолжительность исследования [7].

Такие методики разрабатываются с целью повышения чувствительности, специфичности, воспроизводимости и оперативности получения аналитических данных по сравнению с традиционными фармакопейными методами [7, 8]. В ряде случаев альтернативные методики реализуются в автоматизированных форматах, что обеспечивает регистрацию, обработку и предоставление результатов в виде стандартизированного отчета по проведенному исследованию.

В 2000 г. Американской ассоциацией по парентеральным лекарственным средствам (Parenteral Drug Association, PDA) был выпущен первый официальный документ, регламентирующий принципы оценки, валидации и внедрения альтернативных микробиологических методик⁸. В 2006 г. Центром по оценке и исследованию биологических препаратов (Center for Drug Evaluation and Research, CDER) Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) была опубликована статья, посвященная применению ускоренных микробиологических методов, в которой авторы продемонстрировали преимущества новых подходов по сравнению с фармакопейными — в первую очередь по скорости получения результата и точности при контроле качества лекарственных средств [9].

В Европейской фармакопее⁹ все альтернативные микробиологические методики разделены на 3 типа:

- основанные на росте клетки (позволяют обнаружить жизнеспособные микроорганизмы после короткого инкубационного периода в жидких или на плотных модифицированных питательных средах);
- прямого определения/подсчета (позволяют обнаружить жизнеспособные клетки без культивирования микроорганизмов);
- компонентный анализ клетки (например, амплификация ДНК или РНК с помощью полимеразной цепной реакции).

Некоторые альтернативные методики сочетают фармакопейные и альтернативные подходы к анализу стерильности.

Близкой к традиционным методам испытания является методика, основанная на способности микроорганизмов к росту с выделением CO_2 и возможности его обнаружения в среде

⁷ ОФС.1.1.0021.18 Валидация микробиологических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁸ Validation of growth-based rapid microbiological methods for sterility testing of cellular and gene therapy products. Guidance for industry. FDA, CDER; 2008.

⁹ 5.1.6. Alternative methods for control of microbiological quality. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021.

культивирования. Одним из ключевых достоинств этой методики является высокая чувствительность, что позволяет фиксировать минимальные концентрации CO_2 , выделяемого на ранних стадиях роста микроорганизмов. В отличие от фармакопейного метода, предполагающего визуальную оценку прозрачности среды, колориметрическая методика основана на регистрации изменений pH питательной среды вследствие растворения образовавшегося CO_2 , что сопровождается изменением цвета встроенного во флакон индикатора.

В результате метаболической активности аэробные и анаэробные микроорганизмы, включая дрожжевые и плесневые грибы, при инкубации в соответствующих жидких питательных средах выделяют CO_2 . Кумулятивная концентрация CO_2 и изменение кислотности среды в герметично закрытых инкубационных флаконах коррелирует с уровнем микробной контаминации и может быть детектирована с использованием специализированных сенсорных систем [6]. Непрерывный автоматизированный мониторинг (с интервалом измерений около 10–15 мин) и автоматизация построения кривых роста микроорганизмов позволяют исключить влияние человеческого фактора. Еще одним важным преимуществом является существенное сокращение времени анализа – при использовании колориметрических систем регистрация сигнала возможна уже через 24–120 ч в зависимости от вида оборудования и типа микроорганизмов, в то время как фармакопейные методы требуют инкубации продолжительностью до 14 сут¹⁰.

Данный принцип реализован, в частности, в автоматизированной системе микробиологического контроля BacT/ALERT 3D Dual T (bioMérieux SA, Франция), позволяющей проводить непрерывный мониторинг роста микроорганизмов по уровню продуцируемого CO_2 . BacT/ALERT 3D Dual T представляет собой высокотехнологичную платформу, обеспечивающую инкубацию флаконов с тестируемыми образцами в специализированных модулях с одновременным их покачиванием, что способствует оптимизации условий для микробного роста. Одновременно осуществляется непрерывный мониторинг оптических изменений, регистрируемых цветозменяющимися сенсорами, отражающими метаболическую активность микроорганизмов.

Анализатор характеризуется высокой пропускной способностью: до 240 флаконов могут инкубироваться и анализироваться параллельно в автоматическом режиме. На территории Российской Федерации и в других странах данный прибор широко используется для контроля стерильности гемопрепаратов, а также других стерильных биологических жидкостей, включая ликвор, лимфу и синовиальную жидкость [10]. Результаты многих исследований подтверждают, что система позволяет выявить присутствие в том числе и медленно растущих микроорганизмов в течение сравнительно короткого периода времени – от 24 до 72 ч [11]. В соответствии с требованиями Европейской фармакопеи инкубация флаконов с отсутствием признаков роста продолжается вплоть до 7 сут¹¹, что обеспечивает необходимую чувствительность и соответствие нормативным стандартам.

В 2010 г. исследовательская группа под руководством С. Mastronardi выполнила комплексную валидационную оценку функциональных характеристик системы BacT/ALERT, в ходе которой было установлено, что все целенаправленно внесенные в образцы аэробные и анаэробные микроорганизмы были обнаружены в течение 28 ч, за исключением *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*), инкубация которых до момента выявления составила около 134 ч [12]. Авторами данной работы ранее было проведено валидационное исследование, подтвердившее применимость альтернативной методики, реализованной в системе BacT/ALERT 3D Dual T, для анализа стерильности различных групп лекарственных средств, включая субстанции, биотехнологические, биологические ЛП, биомедицинские клеточные продукты и высокотехнологичные лекарственные средства¹² [13–15].

Питательные среды в контроле стерильности методом определения CO_2 . Фармакопейные методы определения стерильности традиционно основываются на применении двух стандартных жидких питательных сред – триптиказо-соевого бульона и жидкой тиогликолевой среды, обеспечивающих рост аэробных и анаэробных микроорганизмов соответственно¹³. Однако корректировка условий выполнения методик в части используемых питательных сред остается важным направлением микробиологической практики. Были созданы

¹⁰ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

¹¹ 5.1.6. Alternative methods for control of microbiological quality. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021.

¹² Рощина МВ. Применение альтернативных микробиологических методов для испытания стерильности лекарственных препаратов: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. М.; 2018.

¹³ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

модифицированные среды, рецептурный состав которых изменен с целью их адаптации под специфические задачи (например, создание анаэробной среды и др.) и требования к чувствительности, селективности и воспроизводимости методики [15].

TSB и FTM предназначены для выявления стандартного набора тест-штаммов, рекомендованных фармакопеями (например, *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans* и др.). Однако в случае медленнорастущих бактерий (например, *Cutibacterium acnes*), поврежденных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов с длительным периодом латентности может потребоваться до 9–14 сут инкубации при строгом анаэробии [16], что неприемлемо для потенциально нестабильных ВТЛП, требующих быстрого выпуска и применения.

Значимой проблемой при использовании автоматизированных систем является оценка возможности получения ложноотрицательных результатов [17]. Их недооценка может повлечь за собой искажение результатов испытаний. При использовании питательной среды SA для детекции плесневых грибов было зафиксировано от 13 до 70% ложноотрицательных результатов в зависимости от вида исследуемых микроорганизмов. На рисунке 1 видна локализованная микробная колонизация в пригорловом участке флаконов iLYM и одиночные микромицетные включения сферической формы, свободно плавающие в питательной среде SA. Это свидетельствует о том, что система

не регистрировала рост, несмотря на его визуальное наличие во флаконах. В ходе оценки ростовых характеристик питательной среды iLYM было установлено, что кратковременная аэрация флакона с помощью стерильной полой иглы в течение 5–7 с позволяет существенно уменьшить частоту ложноотрицательных результатов (табл. 2).

При проведении испытаний с использованием питательных сред TSB и FTM случаев получения ложноотрицательных результатов не выявлено, так как детекцию микробного роста осуществляли визуально, а при возникновении сомнений в интерпретации признаков помутнения или осадка выполняли пересев исследуемых образцов на питательные среды, рекомендованные ведущими фармакопеями для выявления бактерий и дрожжевых и плесневых грибов. Применение данного подтверждающего этапа обеспечивало достоверность полученных результатов. Использование питательных сред SA и SN для выявления аэробных и анаэробных бактерий соответственно не сопровождалось получением ложноотрицательных результатов, что указывает на достаточную чувствительность и пригодность данных сред для контроля в соответствии с установленными требованиями [13]. При применении питательных сред SA и iLYM для выявления *Candida albicans* ложноотрицательные результаты не зафиксированы, различия во времени детекции между средами не достигали статистической значимости ($p > 0,05$).



Фотография выполнена авторами / The photo is taken by the authors

Рис. 1. Флаконы с выявленными ложноотрицательными результатами определения плесневых грибов. Зеленая крышка – среда iLYM без аэрации; синяя крышка – среда SA; ложноотрицательные результаты отмечены красным

Fig. 1. Bottles with false negative results of mold detection. Green cap, iLYM medium non aerated; blue cap, SA medium; false negative results are marked in red

Таблица 2. Количество ложноотрицательных результатов при определении плесневых грибов с помощью системы BacT/ALERT 3D Dual T**Table 2.** The number of false negative results of mold determination using the BacT/ALERT 3D Dual T system

Название микроорганизма <i>Microorganism</i>	Ложноотрицательные результаты при применении питательных сред, % <i>False-negative results for growth media, %</i>		
	SA	iLYM без аэрации <i>iLYM not aerated</i>	iLYM с аэрацией <i>iLYM aerated</i>
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	27	17	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	68	14	0
<i>Aspergillus terreus</i>	13	12	0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	70	33	3

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Продолжительность инкубации. Согласно предписаниям большинства ведущих фармакопей¹⁴, вне зависимости от применяемой методики (прямой посев, мембранная фильтрация) продолжительность инкубации при проведении анализа стерильности должна составлять не менее 14 сут. Исключение представляет Индийская фармакопея¹⁵, допускающая сокращение инкубационного периода до 7 сут в случае анализа лекарственных препаратов, подвергшихся финишной стерилизации. Кроме того, Европейская фармакопея предусматривает возможность сокращения срока инкубации до 7 сут для отдельных категорий лекарственных средств при применении альтернативных подходов к определению стерильности при условии демонстрации эквивалентной чувствительности метода и его соответствующей валидации¹⁶.

Современные требования Надлежащей производственной практики (Good Manufacturing Practice, GMP)¹⁷ и Управления рисками при обеспечении качества (Quality Risk Management, QRM, ICH Q9)¹⁸ предполагают соответствие применяемых аналитических стратегий уровню рисков, присущих конкретному продукту. Для ВТЛП, особенно нестабильных или используемых при неотложных состояниях пациентов, применение альтернативных валидированных методов микробиологического анализа с сокращенным временем получения результата — не только допустимая, но и рекомендованная

практика, отражающая принцип «контроль, ориентированный на продукт».

Авторами было проведено сравнение времени детекции микроорганизмов, внесенных в ВТЛП, в рамках анализа их стерильности при использовании традиционной и альтернативной методики (рис. 2). Полный спектр контаминирующих ВТЛП микроорганизмов может быть обнаружен в течение 7 сут инкубации вне зависимости от используемого для анализа объема образца. При использовании автоматизированной системы BacT/ALERT 3D Dual T время выявления микробной контаминации (за исключением *C. albicans*) сокращается на 0,38–2,4 сут по сравнению с традиционным методом прямого посева, что согласуется с литературными данными [18]. При варьировании объемов ВТЛП время детекции контаминации альтернативной методикой не изменяется, различия между группами не достигают уровня статистической значимости ($p > 0,05$).

Объем образца. Одним из ключевых факторов, влияющих на получение достоверных результатов анализа стерильности, является объем исследуемого образца. Снижение объема пробы ВТЛП при проведении испытаний — это критически важный аспект, имеющий большое практическое значение. Большинство ВТЛП производятся малыми партиями, часто в условиях персонализированной или экспериментальной

¹⁴ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

2.6.1. Sterility. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021.

<71> Sterility Tests. United State Pharmacopoeia. 47–NF42. 2024.

4.06. Sterility Test. Japanese Pharmacopoeia. XVIII ed. V. 1. Tokyo; 2021.

¹⁵ 2.6.1. Test for Sterility. Indian Pharmacopoeia. V. 1. New Delhi; 2021.

¹⁶ 2.6.27. Microbiological examination of cell-based preparations. European Pharmacopoeia. 11.0 ed. Strasbourg: EDQM; 2021.

¹⁷ Current Good Manufacturing Practice (CGMP) Regulations. FDA; 2013.

¹⁸ ICH guideline Q9 on quality risk management. EMA; 2015.

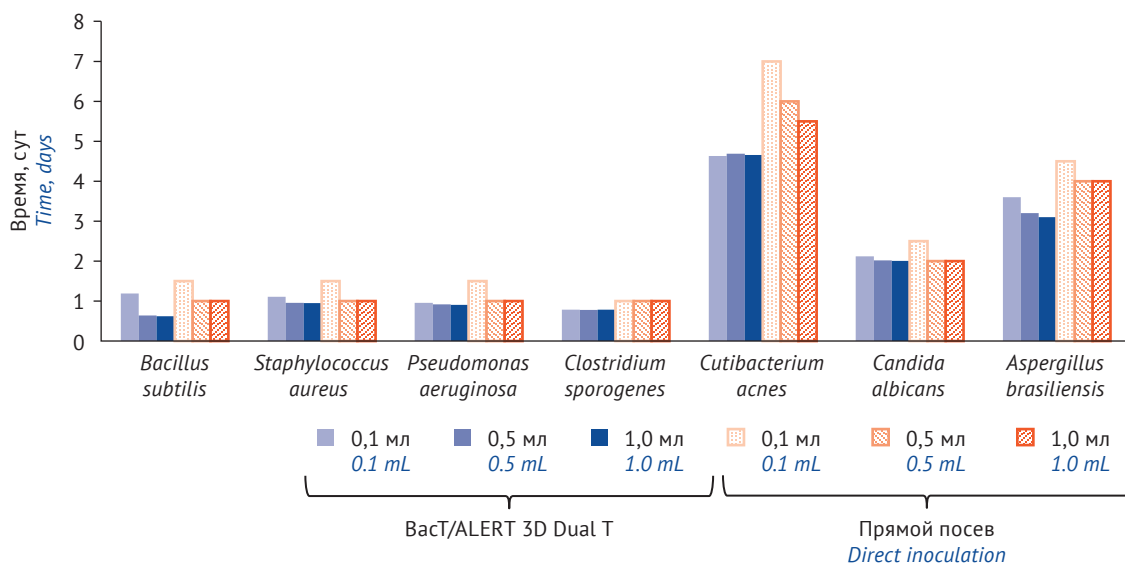


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Медиана времени выявления микроорганизмов, контаминирующих пробы высокотехнологичного лекарственного препарата разного объема, с применением фармакопейной и альтернативной методик

Fig. 2. Median time of microorganism contamination detection of advanced therapy medicinal product in different volumes using pharmacopoeial and alternative methods

терапии. Объем готовой продукции может быть ограничен миллилитрами, а стоимость – достигать миллионов рублей за дозу [19]. Поэтому отбор даже нескольких миллилитров, необходимых для классического микробиологического исследования, может существенно повлиять на доступность терапии для пациента.

ВТЛП часто выпускают в режиме «точно в срок» строго для лечения конкретного пациента. Повторный отбор той же серии невозможен из-за нестабильности действующего вещества, биологических ограничений (модифицированные клетки теряют жизнеспособность), индивидуального характера терапии (например, аутологичный клеточный продукт). Соответственно, снижение объема пробы для анализа критично для обеспечения сохранности терапевтической дозы.

В связи с вышесказанным было проведено исследование, позволяющее экспериментально установить минимальное количество ВТЛП, которое позволяет обнаружить микроорганизмы в исследуемом образце (табл. 3).

Оптимальный объем пробы ВТЛП, обеспечивающий надежную детекцию микроорганизмов при использовании фармакопейных питательных сред, составляет 1,0 мл на каждую среду. В то же время при применении автоматизированной системы BacT/ALERT 3D Dual T эффективным для посева объемом образца на каждую из сред является 0,5 мл (табл. 3).

Данные результаты демонстрируют высокую чувствительность и эффективность автоматизированной системы при меньшем расходе исследуемого образца, что особенно актуально при контроле качества дорогостоящих и ограниченных по объему ВТЛП.

ВЫВОДЫ

1. Колориметрическое определение углекислого газа в питательной среде с использованием системы BacT/ALERT 3D Dual T характеризуется более высокой чувствительностью, скоростью выполнения анализа и воспроизводимостью результатов по сравнению с традиционной фармакопейной методикой, что позволяет считать указанный метод перспективным для определения стерильности ВТЛП.

2. При использовании стандартных фармакопейных сред (TSB и FTM), а также модифицированных сред SA и SN при детекции аэробных и анаэробных бактерий из ВТЛП ложноотрицательные результаты не были зафиксированы, тогда как при выявлении плесневых грибов на питательной среде SA их количество составило от 15 до 70%. Применение питательной среды iLYM при условии ее кратковременной аэрации устраняло данное ограничение автоматизированной системы, значительно повышая надежность альтернативного метода.

3. Достоверно выявить полный спектр потенциальных контаминантов с помощью альтер-

Таблица 3. Правильность выявления групп микроорганизмов в высокотехнологичных лекарственных препаратах с использованием различных методик (К, %)**Table 3.** Accuracy of microorganism group identification introduced in different volumes of advanced therapy medicinal products (K, %)

Микроорганизмы <i>Microorganisms</i>	Питательная среда <i>Nutrient media</i>	Объем исследуемой пробы, мл <i>Volume of the studied sample, mL</i>					
		0,1		0,5		1,0	
		ВасТ/ ALERT	Прямой посев <i>Direct inoculation</i>	ВасТ/ ALERT	Прямой посев <i>Direct inoculation</i>	ВасТ/ ALERT	Прямой посев <i>Direct inoculation</i>
Аэробные бактерии <i>Aerobic bacteria</i>	SA/FTM	50–70	20–60	80–100	50–90	90–100	80–100
Анаэробные бактерии <i>Anaerobic bacteria</i>	SN/FTM	30–50	10–40	80–90	50–90	100	80–100
Дрожжевые грибы <i>Yeast</i>	iLYM аэрированная <i>iLYM aerated/TSB</i>	30	20	90	80	100	100
Плесневые грибы <i>Mold</i>	iLYM аэрированная <i>iLYM aerated/TSB</i>	40	20	80	60	100	90

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Данные, выделенные красным цветом, не удовлетворяют критерию приемлемости $\geq 70\%$

Note. Data marked in red does not meet the acceptance criterion $\geq 70\%$

нативной методики колориметрического определения концентрации CO_2 с использованием модифицированных питательных сред возможно на 0,38–2,4 сут быстрее, что оптимизирует контроль качества ВТЛП.

4. Для определения стерильности изучаемого ВТЛП альтернативным методом минимально необходимым количеством образца при внесении в каждую питательную среду является проба объемом 0,5 мл.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gonçalves E. Advanced therapy medicinal products: Value judgment and ethical evaluation in health technology assessment. *Eur J Health Econ.* 2019;21(3):311–20. <https://doi.org/10.1007/s10198-019-01147-x>
- Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of fungal infection associated with injection of methylprednisolone acetate solution from a single compounding pharmacy. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012; 61(41):839–42. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6141a2>
- Bertoletti da Silva S, Rebello Lourenço F. Risk of false compliance/non-compliance decisions for sterility test due to false-negative and false-positive test results. *Chemometr Intell Lab Syst.* 2020;200:104005. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104005>
- Deutschmann S, Paul M, Claassen-Willemse M, et al. Rapid sterility test systems in the pharmaceutical industry: Applying a structured approach to their evaluation, validation and global implementation. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2023;77(3):211–35. <https://doi.org/10.5731/pda-jpst.2021.012672>
- Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al. BacT/Alert: An automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Microbiol.* 1990;28(7):1608–12. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.7.1608-1612.1990>
- Goula A, Gkioka V, Michalopoulos E, et al. Advanced therapy medicinal products: challenges and perspectives in regenerative medicine. *J Clin Med Res.* 2020;12(12):780–6. <https://doi.org/10.14740/jocmr3964>
- Рощина МВ, Сахно НГ, Гунар ОВ. Подходы к валидации альтернативной методики определения стерильности высокотехнологичных лекарственных препаратов. *Химико-фармацевтический журнал.* 2025;59(2):58–64. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2025-59-2-58-64>
- Roshchina MV, Sakhno NG, Gunar OV. Approaches to the validation of an alternative method for determining the sterility of high-tech medicines. *Pharm Chem J.* 2025;59(2):258–63. <https://doi.org/10.1007/s11094-025-03386-0>
- Woods M, Lu H-Y, Benard F. Validation of the BacT/ALERT® 3D System for Sterility Testing of a ^{177}Lu -radiopharmaceutical. *J Nucl Med.* 2025;66(Suppl 1):25146.
- Jimenez L, Rana N, Amalraj J, et al. Validation of the BacT/ALERT® 3D system for rapid sterility testing of biopharmaceutical samples. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2012;66(1):38–54. <https://doi.org/10.5731/pda-jpst.2012.00790>
- Hussong D, Mello R. Alternative microbiology methods and pharmaceutical quality control. *Am Pharm Rev.* 2006;9(1):62–9.
- Rohner P, Pepey B, Auckenthaler R. Comparison of BacT/ALERT with Signal blood culture system. *J Clin Microbiol.* 1995;33(2):313–7. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.2.313-317.1995>
- Mastronardi C, Perkins H, Derksen P, et al. Evaluation of the BacT/ALERT 3D system for the implementation of in-house quality control sterility testing at Canadian Blood Services. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(8):1179–87. <https://doi.org/10.1515/ccclm.2010.240>
- Рощина МВ, Гунар ОВ, Сахно НГ. Применимость альтернативного метода для анализа стерильности лекарственных препаратов. *Химико-фармацевтический журнал.* 2017;51(11):61–4. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-11-61-64>
- Roshchina MV, Gunar OV, Sakhno NG. Applicability of an alternative method for sterility

- Testing of medicinal preparations. *Pharm Chem J.* 2018; 51(11):1045–8. <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1737-1>
14. Рощина МВ, Гунар ОВ, Сахно НГ. Методические особенности анализа стерильности биомедицинских клеточных продуктов. *Биофармацевтический журнал.* 2017;9(6):3–8. Roshchina MV, Gunar OV, Sakhno NG. Methodological features of sterility testing of biomedical cellular products. *Biopharmaceutical Journal.* 2017;9(6):3–8 (In Russ.). EDN: XHAWNY
 15. Рощина МВ, Гунар ОВ, Сахно НГ. Предел обнаружения микроорганизмов при определении стерильности лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал.* 2017;51(6):62–4. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-6-62-64>. Roshchina MV, Gunar OV, Sakhno NG. Limit of detection of microorganisms in drug sterility testing. *Pharm Chem J.* 2017;51(6):508–10. <https://doi.org/10.1007/s11094-017-1644-x>
 16. Kvich L, Jensen PØ, Justesen US, et al. Incidence of *Propionibacterium acnes* in initially culture-negative thioglycollate broths: A prospective cohort study at a Danish university hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(11):941–5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.036>
 17. Kocoglu ME, Bayram A, Balci I. Evaluation of negative results of BacT/Alert 3D automated blood culture system. *J Microbiol.* 2005;43(3):257–9. PMID: 15995643
 18. Bugno A, Lira RS, Oliveira WA, et al. Application of the BacT/ALERT® 3D system for sterility testing of injectable products. *Braz J Microbiol.* 2015;46(3):743–7. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140587>
 19. Hanna E, Rémuzat C, Auquier P, et al. Advanced therapy medicinal products: Current and future perspectives. *J Mark Access Health Policy.* 2016;4(1):31036. <https://doi.org/10.3402/jmahp.v4.31036>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *М.В. Рощина* — работа с источниками литературы, выполнение эксперимента, написание текста рукописи; *Н.Г. Сахно* — проведение эксперимента, обработка первичных данных и проведение вычислений; *О.В. Гунар* — концепция исследования, редактирование, критический пересмотр и утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contribution were as follows. *Marina V. Roshchina* analysed literature, performed experiments, and composed the manuscript. *Nadezhda G. Sakhno* performed the experiments, processed primary data, and provided basic calculations. *Olga V. Gunar* conceptualised the research, edited the manuscript, and critically reviewed the text.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Рощина Марина Владимировна, канд. фарм. наук / **Marina V. Roshchina**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5966-5822>

Сахно Надежда Геннадьевна, канд. фарм. наук / **Nadezhda G. Sakhno**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1773-7423>

Гунар Ольга Викторовна, д-р фарм. наук / **Olga V. Gunar**, Dr. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4825-8356>

Поступила 04.07.2025

После доработки 22.07.2025




Принята к публикации 07.08.2025

Received 4 July 2025

Revised 22 July 2025

Accepted 7 August 2025



Е.А. Смирягин 
О.Г. Корнилова 
В.Л. Багирова 

Определение содержания примеси гистамина в биологических лекарственных средствах: перспективы перехода от методов *in vivo* к методам *in vitro*

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Смирягин Егор Антонович; smiryaginea@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Наличие в лекарственных средствах (ЛС) примесей, снижающих артериальное давление, может привести к возникновению нежелательных побочных реакций у пациентов. К таким примесям относят гистамин и другие депрессорные вещества. Методика количественного определения примеси гистамина, представленная в действующей общей фармакопейной статье «Испытание на гистамин» Государственной фармакопеи Российской Федерации, основана на взаимодействии гистамина с H1-рецепторами кишечника морской свинки. Однако внедрение концепции 3R (Замена, Сокращение, Усовершенствование; Replacement, Reduction, Refinement) в качестве международного стандарта и отказ ведущих фармакопей от проведения *in vivo* испытаний на содержание примеси гистамина создает необходимость разработки *in vitro* методов количественного определения данного вещества.

ЦЕЛЬ. Выбор перспективного *in vitro* метода количественного определения примеси гистамина в качестве альтернативы испытаниям *in vivo*.

ОБСУЖДЕНИЕ. Проведен анализ стратегии Европейской фармакопеи, направленной на отказ от биологических испытаний на содержание примеси гистамина в ЛС. На основании анализа научной литературы установлены наиболее часто используемые физико-химические и иммунохимические методы количественного определения примеси гистамина. Систематизированы условия методик с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Показана возможность проведения непрямого конкурентного гетерофазного иммуноферментного анализа (ИФА) для количественной оценки гистамина в биологических лекарственных средствах. Обоснованы критерии выбора между ВЭЖХ и ИФА, основанные на специфике матрицы исследуемой субстанции.




ВЫВОДЫ. В целях количественного определения примеси гистамина в биологических лекарственных средствах могут быть использованы методы ВЭЖХ и ИФА. Методики *in vitro* разрабатывают исходя из состава, строения и свойств матрицы исследуемой субстанции; для структурно гетерогенных матриц, например, для гепаринов, рекомендуется ВЭЖХ, для субстанций пептидной и белковой природы, например, для аprotинина, – ИФА.

Ключевые слова: гистамин; примесь; количественное определение; биологические испытания; *in vitro* методики; высокоэффективная жидкостная хроматография; ВЭЖХ; иммуноферментный анализ; ИФА; концепция 3R

Для цитирования: Смирягин Е.А., Корнилова О.Г., Багирова В.Л. Определение содержания примеси гистамина в биологических лекарственных средствах: перспективы перехода от методов *in vivo* к методам *in vitro*. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(5):595–603. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-5-595-603>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200096-0).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Egor A. Smiryagin ,
Olga G. Kornilova ,
Valeria L. Bagirova 

Identifying Histamine Impurity in Biological Products: Prospective Transition from *in vivo* to *in vitro* Methods

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Egor A. Smiryagin; smiryaginea@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Drug impurities lowering blood pressure can cause side effects in patients. These impurities include histamine and other depressor substances. The current General pharmacopoeial monograph “Test for Histamine” of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation presents a quantification method of histamine impurity based on histamine interaction with H1 receptors of the guinea pig intestine. However, 3R concept (Replacement, Reduction, Refinement) introduced as an international standard and decision of leading pharmacopoeias to exclude *in vivo* histamine tests makes it necessary to develop *in vitro* methods for quantification of histamine impurity.

AIM. This study aimed to select an advanced *in vitro* method for quantification of histamine impurity as an alternative to *in vivo* tests.

DISCUSSION. Strategy of European Pharmacopoeia aimed at abandoning biological tests for histamine drug impurities was analysed. Scientific literature has shown the most common physicochemical and immunochemical methods for quantification of histamine impurity. The authors systematised test methods using high-performance liquid chromatography (HPLC). Indirect competitive heterogenous enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was shown feasible for histamine quantification in the biological drugs. Choice between HPLC and ELISA was based the matrix of a test substance.

CONCLUSIONS. HPLC and ELISA are promising quantification methods of histamine impurity in biological products. *In vitro* methods are developed according to the composition, structure, and matrix properties of a test substance. Heterogenous matrices, such as heparins, profit from HPLC, while ELISA is recommended for peptides and proteins, for example aprotinin.

Keywords: histamine; impurity; quantification; biological tests; *in vitro* methods; high-performance liquid chromatography; HPLC; enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA; 3R concept

For citation: Smiryagin E.A., Kornilova O.G., Bagirova V.L. Identifying histamine impurity in biological products: prospective transition from *in vivo* to *in vitro* methods. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(5):595–603. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-5-595-603>

Funding. The study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00001-25-01 (R&D Registry No. 124022200096-0).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

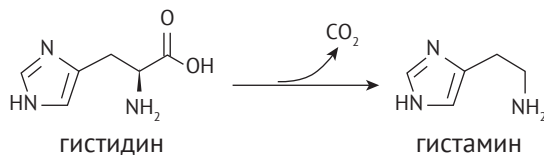
Депрессорные (гистаминоподобные) вещества – общее название широкого спектра соединений, вызывающих при внутрисосудистом введении понижение артериального давления. В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ)¹ испытание на депрессорные вещества проводят для гепарина натрия, эноксапарина натрия, даунорубицина гидрохлорида, доксорубицина гидрохлорида, митомицина и канамицина сульфата кислого [1].

К депрессорным веществам, которые могут присутствовать в лекарственных средствах (ЛС), в том числе относят гистамин. Гистамин (2-(4-имидазолил)этиламин) – биогенный амин, участвующий в местных иммунных реакциях, а также в регуляции физиологического функционирования кишечника и действующий как нейромедиатор [2]. Существует два пути метаболизма гистамина в организме человека: окислительное дезаминирование под действием диаминооксидазы и кольцевое метилирование с помощью гистамин-N-метилтрансферазы [3]. Непереносимость

¹ ОФС. 1.1.1.0019 Испытание на гистамин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2025.

гистамина возникает в результате нарушения равновесия между накопленным гистамином и способностью к его метаболизму. У здоровых людей гистамин может быстро нейтрализоваться аминоксидазами, в то время как люди с низкой активностью аминоксидаз подвержены риску возникновения зуда, головной боли, риноконъюнктивальных симптомов, гипотонии, аритмии, гиперемии, диареи и других состояний [4].

В организме человека гистамин является центральным медиатором аллергической реакции. Воздействие аллергена на пациентов с сенсибилизацией иммунной системы вызывает высвобождение гистамина в базофилах (тучных клетках) [5]. Гистамин также может образовываться в результате поступления веществ, инициирующих процесс его биосинтеза. Гистамин синтезируется из аминокислоты гистидин при участии фермента L-гистидиндекарбоксилазы, коферментом которого является пиридоксальфосфат:



Возможен и экзогенный путь поступления данного амина, например, употребление богатой гистамином пищи или прием ЛС, загрязненных гистамином.

Существует несколько возможных путей загрязнения ЛС примесью гистамина. Основная причина загрязнения ЛС, получаемых из тканей и органов животных, – нарушение технологического процесса на этапе работы с сырьем. К таким ЛС относят, например, аprotинин, который получают из органов крупного рогатого скота. Неправильное хранение или нарушение сроков обработки могут привести к загрязнению продукции как гистамином, так и другими vasoактивными соединениями [6].

Возможно также загрязнение гистамином ЛС, получаемых путем ферментации. Примером такой субстанции служит даунорубицин гидрохлорид, представляющий собой смесь компонентов, продуцируемых определенными штаммами микроорганизмов (*Streptomyces coeruleorubidus*, *Streptomyces peucetius*). В таком случае загрязнение гистамином может происходить в результате наличия в питательных средах пептона животного происхождения, богатого гистидином,

например рыбного [1]. Избыток гистидина в питательной среде может привести к синтезу гистамина при использовании в производстве штаммов-продуцентов, способных декарбоксиллировать гистидин (например, *Escherichia coli*, бактерий родов *Lactobacillus*, *Staphylococcus*) или при контаминации микроорганизмами с гистидин-декарбоксилазной активностью.

Помимо субстанций аprotинина и даунорубицина гидрохлорида, Европейская фармакопея (Ph. Eur.) ранее устанавливала требования к контролю примеси гистамина в трипсине² и химотрипсине³. Стандартная методика, изложенная в общей фармакопейной статье (ОФС) «Испытание на гистамин» ГФ РФ⁴, включает в себя регистрацию сокращений изолированного отрезка подвздошной кишки морской свинки в изотонических условиях в ответ на введение растворов, содержащих известные концентрации гистамина дигидрохлорида и испытуемого раствора. Однако в условиях гармонизации с ведущими фармакопеями мира и реализации концепции 3R (Замена, Сокращение, Усовершенствование; Replacement, Reduction, Refinement) использование животных при проведении биологического испытания на гистамин неэтично. Кроме того, данное *in vivo* испытание требует большого количества времени, является неспецифичным и приводит к вариативным результатам [7].

В результате предыдущих исследований была установлена возможность использования метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в различных модификациях для идентификации гистамина в конкретных ЛС [1, 6]. В данной работе проведен более подробный анализ ВЭЖХ-методик, используемых для количественного определения примеси гистамина, а также оценена возможность использования иммунохимических методов анализа.

Цель работы – выбор перспективного *in vitro* метода количественного определения примеси гистамина в качестве альтернативы испытаниям *in vivo*.

Задачи исследования:

- сравнительный анализ фармакопейных подходов контроля содержания гистамина в ЛС;
- анализ возможности использования физико-химических и иммунохимических методов количественного определения гистамина;

² Trypsin. European Pharmacopoeia. 10.4. Strasbourg: EDQM; 2021.

³ Chymotrypsin. European Pharmacopoeia. 10.4. Strasbourg: EDQM; 2021.

⁴ ОФС.1.1.1.0019 Испытание на гистамин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2025.

- обоснование выбора перспективного *in vitro* метода для определения примеси гистамина в качестве альтернативы испытаниям *in vivo*.

Исследование было проведено информационно-аналитическим методом. База источников литературы состоит из научных статей (1996–2024 гг.), доступных в РИНЦ и Scopus. Ключевые слова поиска: гистамин, примесь, количественное определение, биологические испытания, физико-химические методы, ВЭЖХ, иммуноферментный анализ (ИФА). Объектной базой исследования послужили фармакопеи: Ph. Eur., Фармакопея США (USP), Фармакопея Евразийского экономического союза (ЕАЭС) и ГФ РФ⁵.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Подход к испытанию ЛС на содержание примеси гистамина различается в различных зарубежных фармакопеях. В настоящее время *in vivo* методика определения гистамина, изложенная в монографии Ph. Eur., аналогична методике, представленной в ГФ РФ. Стратегия Ph. Eur. направлена на переход от биологических методов испытаний к физико-химическим. В соответствии с утвержденным планом реализации проекта планируется исключение монографии 2.6.10 «Histamine»⁶ из Ph. Eur. 01.01.2026 после выпуска издания 12.1. Кроме того, заявлена разработка монографии 2.5.47 «Histamine in active substances», в которой будут описаны *in vitro* методы определения гистамина, в частности ВЭЖХ и ИФА⁷.

В документе Европейского директората по качеству ЛС и здравоохранения, помимо стратегии исключения биологических испытаний на гистамин и депрессорные вещества из Ph. Eur., описаны основные причины проведения испытаний на животных [7]. Авторы документа утверждают, что большинство *in vivo* методов возникли, когда:

- 1) не была широко распространена надлежащая производственная практика (GMP);
- 2) отсутствовали документы, описывающие требования к валидации методик, например, руководства Международного совета

по гармонизации технических требований к ЛС для медицинского применения (ICH) Q2 (R2)⁸; 3) физико-химические и другие *in vitro* методы были малодоступны.

Развитие современных аналитических методов и внедрение GMP привели к пересмотру взглядов о проведении некоторых испытаний на животных. Например, уже в 1995 г. для ряда монографий Ph. Eur. требования к качеству ЛС по определению примесей гистамина и депрессорных веществ были перенесены в раздел «Производство» и, соответственно, перестали быть обязательными для каждой партии ЛС. Такое решение было принято после анализа данных, свидетельствующих о прохождении вышеперечисленных испытаний в течение значительного периода времени. Соответствующие разделы были оставлены в Ph. Eur. для того, чтобы производители при необходимости могли использовать эти испытания при разработке ЛС⁹.

В 2000 г. с целью сокращения количества испытаний на животных была введена монография «Products of fermentation» (1468)¹⁰. Хотя гистамин и депрессорные вещества не упоминались в этой версии общей монографии, в тексте было указано, что процесс обработки ЛС должен удалять нежелательные продукты трансформации субстратов и прекурсоров или сокращать их количество до минимума.

В 2017 г. сообщалось о нежелательных реакциях, вызванных использованием растворов гентамицина сульфата для инъекций. Было установлено загрязнение субстанции гентамицина сульфата гистамином. Расследование показало, что загрязнение связано с использованием в процессе ферментации сырья рыбного пептона низкого качества. Поскольку эта проблема актуальна для любых продуктов ферментации, общая монография «Products of fermentation» была пересмотрена в 2018 г. В подраздел «Исходное сырье» раздела «Производство» был добавлен следующий тезис: «Особое внимание следует уделять уровню свободного гистидина в рыбных пептонах, поскольку при определенных условиях его присутствие может приводить к образованию гистамина»¹¹. Позднее,

⁵ European Pharmacopoeia. 11.8. Strasbourg: EDQM; 2025. United States Pharmacopoeia. USP-NF. Rockville, MD; 2025. Фармакопея ЕАЭС. М.; 2020. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2025.

⁶ 2.6.10. Histamine. European Pharmacopoeia. 11.8. Strasbourg: EDQM; 2025.

⁷ <https://www.edqm.eu/en/>

⁸ ICH Q2 (R2) Validation of analytical procedures. EMA/CHMP/ICH/82072/2006.

⁹ <https://www.edqm.eu/en/d/296687>

¹⁰ Products of fermentation. European Pharmacopoeia. 11.8. Strasbourg: EDQM; 2025.

¹¹ European Pharmacopoeia. Edition Supplement 9.6. Strasbourg: EDQM; 2019.

в 2020 г., раздел «Последующая обработка» был дополнен¹²: «Необходимо продемонстрировать, что выбранные процедуры сводят к минимуму или обеспечивают полное удаление гистамина и других биогенных аминов из рыбы и рыбопродуктов, используемых в качестве исходного сырья»¹³.

Стратегия ГФ РФ также направлена на сокращение биологических испытаний. Так, например, в тексте ОФС «Испытание на гистамин», утвержденной приказом Минздрава России¹⁴, указано, что описанный метод применяют при фармацевтической разработке ЛС, а также при оценке пригодности технологического процесса. Таким образом, как и в случае Ph. Eur., выполнение испытания не обязательно для каждой партии ЛС.

В КНР, в отличие от стран ЕС, не планирует отказ от биологических испытаний на гистамин. Монография «Испытание на гистамин» Фармакопеи КНР¹⁵ содержит более подробное описание методики испытания, чем аналогичные монографии ГФ РФ и Ph. Eur., в том числе указан диапазон концентраций гистамина двух стандартных растворов, а дополнительно специфицируется пол используемых для испытаний морских свинок.

Методики, описанные в Британской фармакопее, Индийской фармакопее и Фармакопее Бразилии¹⁶, полностью соответствуют методикам Ph. Eur. и ГФ РФ. Фармакопея Бразилии помимо испытаний на гистамин и депрессорные вещества содержит биологическое испытание на вазопрессорные вещества, проводимое на крысах. Однако такой подход не встречается в фармакопеех других стран. В Корейской фармакопее¹⁷ для определения содержания гистамина и других депрессорных веществ используют в качестве тест-моделей кошек. В 11 издании Международной фармакопеи¹⁸ монографии с требованиями испытаний на гистамин и депрессорные вещества были исключены, рассматриваемые монографии также отсутствуют в Японской фармакопее¹⁹ и Фармакопее Таиланда²⁰.

Согласно требованиям Фармакопеи США²¹ контроль депрессорных веществ не предусмотрен, а испытание на гистамин представлено в формате общей главы <426> Histamine test method²², содержащей описание методики ВЭЖХ для определения гистамина в субстанции гентамицина сульфата. В тексте главы указано, что методика валидирована только для гентамицина сульфата, не является универсальной и должна быть валидирована для любых других субстанций. Биологические методы испытания на гистамин в Фармакопее США не представлены.

Анализ данных литературы позволил установить, что ВЭЖХ является наиболее часто используемым физико-химическим методом количественного определения примеси гистамина. Однако высокая полярность молекулы гистамина приводит к плохому удерживанию в типичных для обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ) условиях. Также гистамин не обладает необходимыми абсорбционными свойствами в видимом и ультрафиолетовом (УФ) диапазоне, что затрудняет использование УФ-детектора для его обнаружения. По этим причинам перед ОФХ, как правило, проводят дериватизацию гистамина с использованием флуоресцентных или ион-парных реагентов. Примерами таких реагентов являются дансилхлорид и 9-фторенилметил хлорформиат [8, 9]. Также могут быть использованы комбинации дериватирующих агентов со стабилизаторами образующихся аддуктов, например *o*-фталевый альдегид с 3-меркаптопропионовой кислотой или с *N*-ацетил-*L*-цистеином [10, 11].

Несмотря на преимущества, дериватизация не только требует много времени и средств, но и может привести к ряду дополнительных проблем. Так, для испытуемых растворов, содержащих несколько полярных функциональных групп, реакции дериватизации часто приводят к образованию побочных продуктов и не являются количественными. Еще один недостаток дериватизации заключается в том, что основным фактором удерживания будет присоединенная

¹² European Pharmacopoeia. Edition Supplement 10.4. Strasbourg: EDQM; 2021.

¹³ EMA. Quality of medicines questions and answers: Part 1. EMA; 2021.

¹⁴ Приказ Минздрава России от 11.04.2025 № 188 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей».

¹⁵ 1146 Test for Histamine. Chinese Pharmacopoeia. 2020 Edition.

¹⁶ 2.6.10. Histamine. British Pharmacopoeia. 2025; 2.2.7. Histamine. Indian Pharmacopoeia. Ed. 9.0. 2022; 5.5.2.5. HISTAMINE. The

Brazilian Pharmacopoeia. 6th ed. 2019.

¹⁷ Histamine. Korean Pharmacopoeia. 12th ed. 2024.

¹⁸ The International Pharmacopoeia. 11th ed. 2023.

¹⁹ Japanese Pharmacopoeia. 18th ed. 2021.

²⁰ Thai Pharmacopoeia 2020.

²¹ United States Pharmacopoeia. USP-NF. Rockville, MD; 2025.

²² <426> Histamine test method. United States Pharmacopoeia. USP-NF. Rockville, MD; 2025.

гидрофобная группа, поэтому близкородственные соединения после дериватизации будут разделяться хуже [12]. Добавление ион-парных реагентов может привести к снижению чувствительности при гидрировании на масс-спектрометре [13].

Примером методики, основанной на ОФХ и не требующей модификации гистамина, является упомянутая методика его определения в субстанции гентамицина сульфата. Еще один вариант реализации ВЭЖХ без предварительной дериватизации – проведение нормально-фазовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором [14]. Такой вариант был также использован для количественного определения примеси гистамина в гентамицина сульфате [15]. Промежуточная прецизионность методики составила 8,0%, повторяемость (в процентах относительно стандартного отклонения) – 10,8%, а предел количественного определения – 1,1 ppm.

Другой пример – разработанная белорусскими учеными методика определения гистамина, которая не только не требует масс-спектрометрического детектора (используется флуоресцентный детектор), но и основана на проведении ОФХ [16]. Для этой методики были продемонстрированы избирательность, повторяемость и правильность, а также определены линейность

в диапазоне 20–200 мг/кг, предел обнаружения – 6,6 мг/кг и предел количественного определения – 20,0 мг/кг. Однако необходимо отметить, что данная методика разработана для определения гистамина в рыбе и рыбной продукции.

В *таблице 1* представлены основные параметры методик определения гистамина методом ВЭЖХ. Из данных таблицы следует, что универсального подхода не существует, условия проведения хроматографического анализа будут зависеть от свойств и строения матрицы конкретной исследуемой субстанции. Для субстанций, обладающих отличными от гистамина строением и (или) свойствами, например для гепаринов, возможно проведение анализа методом ВЭЖХ. В этом варианте также допустимо проведение предколонной дериватизации, так как при отсутствии близкородственных соединений дериватирующий агент будет специфично присоединяться к гистамину.

Кроме ВЭЖХ применяют другие физико-химические методы анализа. Например, несмотря на низкую летучесть гистамина, существует ряд методик его определения методом газовой хроматографии (ГХ). В статье [17] авторы используют N,O-бис(триметилсилил)ацетамид в качестве дериватирующего агента, затем проводят парофазный анализ на капиллярной колонке и определяют гистамин

Таблица 1. Основные параметры методик определения гистамина методом ВЭЖХ

Table 1. Main parameters of HPLC analytical procedures for histamine determination

Дериватирующий агент <i>Derivatisation agent</i>	Вариант хроматографии <i>HPLC type</i>	Режим элюирования <i>Elution mode</i>	Детектор <i>Detector</i>
Дансилхлорид <i>Dansyl chloride</i>	Обращенно-фазовая <i>Reverse-phase</i>	Градиентный <i>Gradient</i>	Квадрупольный масс-анализатор <i>Quadrupole mass analyser</i>
Дансилхлорид <i>Dansyl chloride</i>	Обращенно-фазовая <i>Reverse-phase</i>	Изократический <i>Isocratic</i>	Спектрофотометрический на диодной матрице <i>Diode array spectrophotometric detector</i>
9-Фторенилметил хлорформат <i>9-Fluorenylmethyl chloroformate</i>	Обращенно-фазовая <i>Reverse-phase</i>	Изократический <i>Isocratic</i>	Флуоресцентный <i>Fluorescence</i>
орто-Фталевый альдегид и 3-меркаптопропионовая кислота / дитиотреитол / ацетилцистеин <i>o-Phthalaldehyde and 3-mercaptopropionic acid / dithiothreitol / acetylcysteine</i>	Обращенно-фазовая <i>Reverse-phase</i>	Градиентный <i>Gradient</i>	Флуоресцентный или УФ <i>Fluorescence or UV</i>
–	Нормально-фазовая <i>Normal-phase</i>	Градиентный <i>Gradient</i>	Квадрупольный масс-анализатор <i>Quadrupole mass analyser</i>
–	Обращенно-фазовая <i>Reverse-phase</i>	Градиентный <i>Gradient</i>	Масс-анализатор <i>Mass analyser</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. «–» – отсутствие стадии дериватизации.

Note. –, no derivatisation stage.

количественно с помощью пламенно-ионизационного детектора и качественно с помощью масс-спектрометра. Газохроматографическая методика без использования дериватирующих агентов была успешно применена для количественного определения примеси гистамина в рыбных продуктах и мясе креветок [18]. Также для определения гистамина используют тонкослойную хроматографию и капиллярный электрофорез [19, 20].

Кроме физико-химических методов для количественного определения гистамина используют иммунохимические методы анализа. Существует множество коммерческих наборов (тест-систем), однако большинство из них разработано для определения гистамина как пищевого аллергена в продуктах питания²³. Такие тест-системы, как правило, основаны на «сэндвич» (непрямом неконкурентном гетерогенном) варианте ИФА. Для определения гистамина в биологических объектах (в плазме, моче, цельной крови, супернатантах клеточных культур, экстрактах твердых биологических образцов и др.) используют принцип непрямого конкурентного гетерогенного ИФА. При этом существуют 2 способа проведения такого анализа:

- 1) с предварительной сорбцией антигена на планшете. В этом варианте антиген испытуемого образца конкурирует с иммобилизованным на планшете антигеном за связывание с определенным количеством меченого антитела;
- 2) с предварительной сорбцией антитела на планшете. В этом варианте меченый антиген и антиген испытуемого образца конкурируют за связывание с первичным антителом, иммобилизованным на лунки планшета.

Методика определения гистамина, основанная на непрямом конкурентном гетерофазном ИФА, описана в статье Л. Ху и соавт. [21]. Авторы продемонстрировали линейность методики в диапазоне от 100,0 нг/мл до 10,0 мкг/мл. Было показано, что методика позволяет количественно определять гистамин в рыбном пептоне, продуктах питания (креветки, соевый соус), а также в субстанциях антибиотиков (гентамицин, амикацин и пенициллин). Открываемость для образцов данных субстанций, загрязненных гистамином, составляла 76,8–120,0%, предел обнаружения – 89,0 нг/мл. Таким образом, методика позволяет количественно определить экзогенный гистамин в загрязненной примесью гистамина ЛС.

Согласно данной методике, на лунки планшета иммобилизуют конъюгат «гистамин – овальбумин» (Гис-Ова) или «гистамин – бычий сывороточный альбумин» (Гис-БСА). Иммобилизацию гистамина, как правило, проводят в составе конъюгата, так как гистамин является гаптеном (низкомолекулярным веществом, приобретающим необходимую антигенность при увеличении молекулярной массы). Свободные участки связывания белков блокируют 2% (м/о) раствором бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буфере. После трехкратной промывки в соответствующие лунки вносят разведения стандартного образца (гистамина дигидрохлорида) и испытуемого образца, а затем моноклональные антитела к гистамину в фосфатном буфере. Инкубируют, проводят аналогичную промывку. Далее планшеты инкубируют с конъюгатом козьих поликлональных антител к иммуноглобулинам мыши с пероксидазой хрена. Планшеты промывают еще раз. Затем в планшеты добавляют субстрат – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и инкубируют. Ферментативную реакцию останавливают добавлением 2 М H₂SO₄. Значения абсорбции измеряют при 450 нм с помощью планшетного спектрофотометра. Количество гистамина в испытуемых растворах рассчитывают по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям гистамина дигидрохлорида. Сигнал обратно пропорционален количеству антигена в разведениях испытуемого образца.

В другой методике, также включающей стадию предварительной сорбции конъюгатов Гис-Ова или Гис-БСА, конкурентный ИФА-метод используют для определения эндогенного гистамина в образцах сыворотки крови пациентов с аллергическими заболеваниями [22]. Основные этапы испытания аналогичны представленным в статье [21]. Специфичность методики была доказана добавлением в реакционную среду близкородственных гистамину соединений (серотонин, дофамин, β-эндорфин, дерморфин). Максимальное значение конкурентного ингибирования составило 2% при анализе образцов с серотонином, при этом максимальная чувствительность метода составила 2,50 нг/мл.

В другом варианте выполнения анализа предусмотрена предварительная иммобилизация на микропланшет специфичных к гистамину антител²⁴. Производитель тест-системы заявляет об открываемости методики в интервале 111–131% при испытании образцов сыворотки

²³ https://kolba24.ru/product/agraquant_gistamin/

https://stytab-shop.com/product/gistamin_test-sistema_evrika_al0301-48_dlya_kolichestvennogo_opredeleniya_metodom_ifa_48_opredeleniy_10228.html

²⁴ <https://www.abcam.com/en-us/products/elisa-kits/histamine-elisa-kit-ab213975#tab=datasheet>

крови. При этом предел количественного определения составляет 0,098 нг/мл, максимальное значение внутрилабораторной прецизионности – 8,5%, межлабораторной прецизионности – 11,8%. После стадии сорбции антител на планшет в лунки вносят разведения стандартного образца и испытуемого образца с немеченым гистамином. Далее вносят меченый гистамин (конъюгат гистамина с биотином) и проводят инкубацию. Осуществляют промывку, удаляя несвязанные конъюгаты. Во все лунки вносят раствор стрептавидина или авидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, и инкубируют. Планшет промывают для удаления избытка конъюгата. Субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин добавляют в лунки и инкубируют. Для остановки ферментативной реакции добавляют стоп-раствор. Интенсивность реакции определяют при длине волны 450 нм. Количество гистамина в исследуемых образцах рассчитывают по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям в разведениях стандартного образца гистамина.

Количественное определение примеси гистамина с использованием методики ИФА наиболее подходит для варианта, когда гистамин имеет схожее с исследуемой субстанцией строение и (или) свойства. В этом варианте влияние матрицы должно быть минимальным за счет высокой специфичности антител к гистамину. Такой способ может подойти, например, для определения гистамина в аprotинине.

Отечественные тест-системы, основанные на ИФА, способны определять гистамин в про-

дуктах питания. Однако доступные коммерческие наборы для количественного определения примеси гистамина в субстанциях для фармацевтического применения отсутствуют. Это обуславливает необходимость разработки собственных методик и тест-систем, в основе которых может быть использован принцип непрямого конкурентного гетерогенного ИФА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Загрязнение гистамином ЛС может возникнуть при использовании в производстве сырья животного происхождения, богатого гистидином, а также в результате нарушения технологического процесса. Ведущие фармакопеи отказываются от биологических испытаний каждой партии ЛС, указывая на необходимость их проведения только при разработке производства и оценке пригодности технологического процесса. Полный отказ от биологических испытаний на гистамин возможен только при переходе к методам *in vitro*, наиболее перспективными из которых являются ВЭЖХ и ИФА. Проведенный анализ позволяет сделать вывод, что выбор и разработка метода количественного определения примеси гистамина должны быть основаны на составе, строении и свойствах матрицы исследуемой субстанции. Для субстанций, обладающих отличными от гистамина составом и (или) свойствами, например, для гепаринов, подходит проведение анализа с применением ВЭЖХ. Для субстанций, имеющих схожее с гистамином строение, таких как аprotинин, наиболее перспективным является метод ИФА.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Чечетова ЕО, Батуашвили ТА, Неугодова НП. Анализ современных подходов к контролю содержания депрессорных веществ. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(5):553–60. Chechetova EO, Batuashvili TA, Neugodova NP. Analysis of modern approaches to control the content of depressant substances. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(5):553–60 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-5-553-560>
2. Marieb EN, Hoehn K. *Human anatomy & physiology*. 12 ed. Pearson; 2024.
3. Schwelberger HG, Falus A. Diamine oxidase (DAO) enzyme and gene. In: *Histamine: biology and medical aspects*. Budapest, Hungary; 2004. P. 89–109.
4. Maintz L, Novak N. Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(5):1185–96. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1185>
5. Borriello F, Iannone R, Marone G. Histamine release from mast cells and basophils. In: *Histamine and histamine receptors in health and disease*; 2017. P. 121–39. https://doi.org/10.1007/164_2017_18
6. Батуашвили ТА, Симутенко ЛВ, Неугодова НП, Шадрин ПВ. Методические подходы к определению депрессорных веществ в лекарственных средствах. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2020;10(2):137–41. Batuashvili TA, Simutenko LV, Neugodova NP, Shadrin PV. Methodological approaches to the determination of depressor substances in drugs. *Regulatory studies and expertise of medicinal products*. 2020;10(2):137–41 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-137-141>
7. Bratos M, Kolaj-Robin O, Antoni M, Charton E. Ph. Eur. testing for histamine and depressor substances using guinea-pigs and cats: the end of an era. Strategy for removal of animal tests for histamine and depressor substances and their vestiges from the Ph. Eur. *Pharmeur Bio Sci Notes*. 2024;2024:12–26.
8. Tsiasioti A, Zacharis C, Tzanavaras P. Derivatization strategies for the determination of histamine in food samples: A review of recent separation-based methods. *TrAC Trends Anal Chem*. 2023;168:117302. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117302>
9. Malle P, Vallé M, Bouquet S. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J AOAC Int*. 1996;79(1):43–9. <https://doi.org/10.1093/jaoac/79.1.43>
10. Mengerink Y, Kutlán D, Tóth F, et al. Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino

- acid and amine derivatives obtained with the o-phthalaldehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents: High-performance liquid chromatography–mass spectrometry study. *J Chromatogr A*. 2002;949(1-2):99–124. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01282-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01282-1)
11. Ларионова ДА, Штыков СН, Белоглазова НВ, Королева ЕН. Влияние нуклеофильных агентов и организованных сред на флуориметрическое определение гистамина с О-фталевым альдегидом. *Журн. аналит. химии*. 2008;63(11):1147–53. Larionova DA, Shtykov SN, Beloglazova NV, Koroleva EN. Effect of nucleophilic agents and organized media on the fluorimetric determination of histamine with o-phthalic aldehyde. *J Anal Chem*. 2008;63:1044–50. EDN: [LLICTZ](https://doi.org/10.1002/jssc.200600199)
 12. Hemström P, Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci*. 2006;29(12):1784–821. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600199>
 13. Shou W, Naidong W. Simple means to alleviate sensitivity loss by trifluoroacetic acid (TFA) mobile phases in the hydrophilic interaction chromatography–electrospray tandem mass spectrometric (HILIC–ESI/MS/MS) bioanalysis of basic compounds. *J Chromatogr B*. 2005;825(2):186–92. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.01.011>
 14. Nelis M, Decraecker L, Boeckstaens G, et al. Development of a HILIC-MS/MS method for the quantification of histamine and its main metabolites in human urine samples. *Talanta*. 2020;220:121328. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121328>
 15. Gaudiano M, Valvo L, Rodomonte A. A Q-TOF LC/MS method for identification and quantitation of Histamine in the antibiotic Gentamicin at ppm level: Validation and uncertainty evaluation. *J Pharm Biomed Anal*. 2019;162:158–63. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.015>
 16. Почицкая ИМ, Рослик ВЛ, Григорьева ЮД. Расчет метрологических характеристик методики определения гистамина в рыбе и рыбной продукции. В кн.: *Наука, питание и здоровье. Материалы II Международного конгресса*. Минск; 2019. С. 580–9. Pochitskaya IM, Roslik VL, Grigorieva YuD. Calculation of metrological characteristics of the method for determining histamine in fish and fish products. In: *Science, nutrition and health. Proceedings of the II International Congress*. Minsk; 2019. P. 580–9 (In Russ.). EDN: [RSUGKV](https://doi.org/10.32802/asmscj.2021.809)
 17. Munir M, Mackeen M, Heng L, Badri K. Study of histamine detection using liquid chromatography and gas chromatography. *ASM Sc J*. 2021;16:1–9. <https://doi.org/10.32802/asmscj.2021.809>
 18. Hwang B, Wang J, Choong Y. A rapid gas chromatographic method for the determination of histamine in fish and fish products. *Food Chem*. 2003;82(2):329–34. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00005-0)
 19. Kvasnička F, Kavková S, Honzlová A. Electrophoretic determination of histamine. *J Chromatogr A*. 2019;1588:180–4. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.024>
 20. Tao Z, Sato M, Han Y, et al. A simple and rapid method for histamine analysis in fish and fishery products by TLC determination. *Food Control*. 2011;22(8):1154–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.12.014>
 21. Xu L, Zhou J, Eremin S, Dias A, Zhang X. Development of ELISA and chemiluminescence enzyme immunoassay for quantification of histamine in drug products and food samples. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412:4739–47. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02730-5>
 22. Другова ЕД, Мягкова МА. Иммуноферментный метод определения гистамина. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016;(6-5):891–4. Drugova ED, Myagkova MA. Enzyme immunoassay for histamine determination. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2016;(6-5):891–4 (In Russ.). EDN: [WAPCFP](https://doi.org/10.1007/s00216-020-02730-5)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Е.А. Смирягин – написание текста рукописи, формулировка выводов и поиск источников литературы; О.Г. Корнилова – концепция работы, редактирование текста рукописи; В.Л. Багирова – утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Egor A. Smiryagin wrote the manuscript, formulated conclusions and performed literature search. Olga G. Kornilova developed the work concept and manuscript editing. Valeria L. Bagirova approved the final version of the manuscript for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Смирягин Егор Антонович / Egor A. Smiryagin

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-9584-0777>

Корнилова Ольга Геннадьевна, д-р фарм. наук / Olga G. Kornilova, Dr. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1439-2052>

Багирова Валерия Леонидовна, д-р фарм. наук, профессор / Valeria L. Bagirova, Dr. Sci. (Pharm.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0379-6158>

Поступила 09.07.2025

После доработки 07.08.2025

Принята к публикации 07.08.2025

Received 9 July 2025

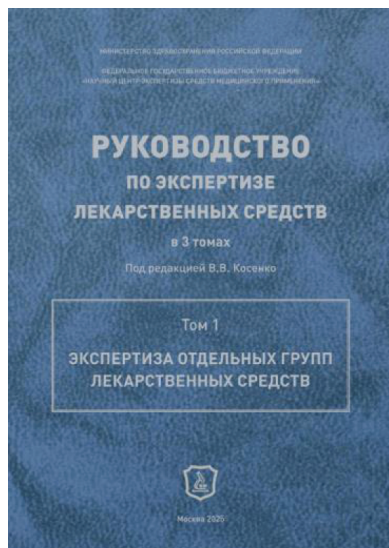
Revised 7 August 2025

Accepted 7 August 2025



2025

РУКОВОДСТВО по экспертизе лекарственных средств в 3 томах



Руководство подготовлено на основе национального законодательства в сфере обращения лекарственных средств, нормативных правовых актов Евразийского экономического союза и правил Европейского агентства по лекарственным средствам.



Том 1. Экспертиза отдельных групп лекарственных средств

Том 2. Экспертиза биологических лекарственных препаратов

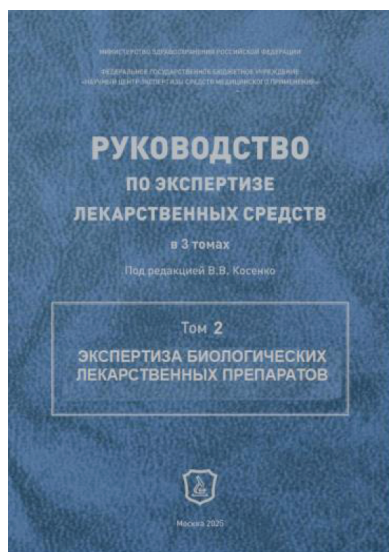
Том 3. Экспертиза качества и безопасность лекарственных средств



Адресовано исследователям, занимающимся разработкой новых лекарственных препаратов, а также специалистам, осуществляющим экспертизу регистрационных досье.



Включение данного руководства в нормативную базу ЕАЭС создаст предпосылки для вывода российских препаратов на европейский рынок.



Подробнее
о приобретении
изданий на сайте
www.regmed.ru
(вкладка «Издания»)



Экспертиза качества и безопасности
лекарственных средств

Доклинические и клинические исследования

Разработка лекарственных препаратов



**Регуляторные исследования
и экспертиза лекарственных средств**

